

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 879**

51 Int. Cl.:

C07K 14/005 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2013 PCT/US2013/067669**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14070975**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2013 E 13789453 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2914618**

54 Título: **Flavivirus asociados a la enfermedad de Theiler**

30 Prioridad:

02.11.2012 US 201261721858 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

20.11.2017

73 Titular/es:

**NOVARTIS TIERGESUNDHEIT AG (50.0%)
Werk Rosental, Schwarzwaldallee 215, WRO-1032
4058 Basel, CH y
CORNELL UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CHANDRIANI, SANJAY;
SKEWES-COX, PETER;
DIVERS, THOMAS;
TENNANT, BUD y
KISTLER, AMY**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 642 879 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Flavivirus asociados a la enfermedad de Theiler

Campo de la divulgación

5 Esta divulgación se refiere al virus asociado a la enfermedad de Theiler ("TDAV", por las siglas en inglés *Theiler's disease-associated virus*), a los reactivos relacionados con el mismo y a los procedimientos para su detección, al uso y/o al tratamiento de enfermedades asociadas al TDAV.

Antecedentes de la divulgación

10 La enfermedad de Theiler es una enfermedad hepática fulminante que afecta a los caballos. La causa de la enfermedad de Theiler todavía no se ha determinado y representa un problema significativo relacionado con el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad. La enfermedad se ha asociado a la administración previa de productos biológicos de origen equino (por ejemplo, antitoxina botulínica, antitoxina tetánica). Se ha observado un retraso significativo entre la exposición al producto biológico y la aparición de la hepatitis aguda, y se determinó que las lesiones histopatológicas asociadas en el hígado eran notablemente similares a las asociadas con la infección aguda humana por el virus de la hepatitis A o el virus de la hepatitis B.

Sumario de la divulgación

15 Esta divulgación describe un nuevo virus que ahora se ha relacionado con la enfermedad de Theiler (el virus asociado a la enfermedad de Theiler ("TDAV")). Se determinó que el TDAV era un miembro de la familia *Flaviviridae* que incluye el virus de la hepatitis C (HCV), el virus B GB, el hepacivirus canino (CHV) y el hepacivirus equino no primate (NPHV). Este nuevo virus, la secuencia de nucleótidos genómica, la secuencia de aminoácidos, así como
20 las composiciones y los procedimientos para la preparación, el uso y/o la detección del mismo, se describen en el presente documento. También se proporcionan reactivos y procedimientos para la detección del TDAV en muestras biológicas. Por lo tanto, esta divulgación proporciona una solución a los problemas relacionados con la detección, el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de la enfermedad de Theiler.

25 En el presente documento se divulga que el TDAV comprende las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de las SEQ ID NOS.: 1, 2 y/o 3. Se describen las moléculas de ácidos nucleicos que comprenden dichas secuencias de ácidos nucleicos y/o que codifican dichas secuencias de aminoácidos. En el presente documento también se proporcionan los procedimientos y los reactivos para la detección del TDAV (que también pueden incluir virus de tipo TDAV), en una muestra (por ejemplo, una muestra biológica tal como sangre completa (por ejemplo, sin diluir o procesada), sangre de cordón umbilical, plasma, suero, suero del cordón umbilical, saliva, linfa, líquido cefalorraquídeo, orina, semen, líquido pleural, leche materna, sudor, ascitis, una muestra de tejido, por ejemplo, de
30 hígado, un producto alimenticio (por ejemplo, carne) o una bebida (por ejemplo, leche), etc.). También se desvelan composiciones que comprenden el TDAV, los ácidos nucleicos, los péptidos y/o los polipéptidos correspondientes al TDAV. También se proporcionan otras realizaciones, según se describe en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

35 **Figura 1. Visión global de un brote epidémico de una enfermedad de Theiler.** Se trataron terapéutica y profilácticamente veintidós caballos de la Granja A con sospecha de una exposición a la toxina botulínica, con plasma hiperinmune antitoxina botulínica equino intravenoso. Cinco caballos recibieron la antitoxina de una fuente (caballos grises, 'antitoxina 1'), mientras que 17 caballos recibieron un lote de una fuente independiente (caballos negros, 'antitoxina 2').
40 Quince de los caballos que participaron en este estudio quedaron sin tratar (caballos blancos, 'sin tratar'). A las 8 semanas de la administración de la antitoxina, 8 de los caballos tratados con la antitoxina 2 mostraron signos de una hepatitis aguda (cajas). Todos los demás caballos eran clínicamente asintomáticos (sin cajas).

Figura 2. Genoma del virus asociado a la enfermedad de Theiler (el TDAV). (A) Esquema del genoma del TDAV. Los sitios de escisión de proteínas son supuestos y se anotaron basándose en una interferencia homóloga con el HCV (Fig. 4). (*) Gen correspondiente a la proteína p7 del HCV, la p13 del GBV-B, la X del GBV-D y el GBV-A de 21 kDa. (B) Mapa de cobertura de las lecturas de secuenciación del Caballo A1, el Caballo A2 y la Antitoxina 2. (C) Tamaño mediano del amplicón calculado basándose en la distancia entre los extremos 5' del cartografiado de las lecturas de secuenciación de los extremos apareados de cada nucleótido. (D) Clones solapantes recuperados y secuenciados para confirmar el ensamblaje del genoma (arriba) y la ubicación de los amplicones usados en el diagnóstico y la cuantificación del TDAV (abajo). (E) Representación gráfica del porcentaje de identidad de los aminoácidos por parejas (ventanas de 100 aa) del TDAV en comparación con el HCV-gt1, el NPHV y el GBV-D. La escala de posición del genoma (inferior) se refiere a los paneles A-E.

50 **Figura 3. Análisis filogenético de *Flaviviridae* basado en secuencias de poliproteínas.** Se generaron múltiples alineaciones de secuencias usando MUSCLE y se generó un árbol filogenético de Neighbor-Joining con 100 réplicas de muestreo con reposición en MEGA5. El TDAV está en negrita para enfatizar. Todas las ramas están numeradas comenzando en ** y aumentan en sentido horario (véase la Tabla S3 para la clave). Los
55

grupos con las ramas más cercanas están marcados con un intervalo de números de la secuencia; un miembro representativo del grupo indicado entre paréntesis con una línea más gruesa indica la ramificación del miembro representativo. WNV = virus del Nilo occidental, DENV = virus del Dengue 1, DV = virus del Donggang, YFV = virus de la fiebre amarilla, MV = virus del Modoc, TBEV = virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, BVDV = virus de la diarrea vírica bovina 1, TDAV = virus asociado a la enfermedad de Theiler, GBV-(A-D) = virus GB (A-D), HCV = genotipo 1 del virus de la hepatitis C, NPHV = NPHV #1 (AFJ20709.1). 't' indica las ramificaciones prácticamente idénticas 8 y 9, que se corresponden con el virus Tembusu y el flavivirus Duck TA, respectivamente.

Figura 4 A-N. Alineación de múltiples secuencias de las secuencias de poliproteínas del virus de la Hepatitis C, de los virus GB, del hepacivirus canino y del TDAV. Se alinearon los seis genotipos del HCV, los cuatro virus de GB, el hepacivirus canino y el TDAV usando MUSCLE y se visualizaron en ClustalX v2.0. Un '*' encima de la columna indica una perfecta conservación, un '.' indica un elevado grado de conservación, y un ':' indica similitud en los aminoácidos a lo largo de la totalidad de la columna. El gráfico de barras por debajo de la alineación muestra la fracción de los miembros de la columna que se emparejan en consenso.

Figura 5. Un ensayo diagnóstico basado en una PCR cuantitativa para detectar el TDAV en diferentes grupos. Los ciclos hasta el umbral (C_t) en el ensayo diagnóstico de qRT-PCR del TDAV (cebadores EVT-146/147) están representados en un eje y invertido; un menor valor de C_t representa una mayor carga vírica. (A) Suero/plasma de los caballos tratados de las Granjas A, B y D con un listado del tratamiento con la antitoxina indicada. (B) Resultados de la Granja A, los animales tratados con la antitoxina 2 únicamente se segregaron si el caballo mostraba signos de hepatitis. Se indica la gravedad de los síntomas (clínicos y subclínicos).

Figura 6 A-E. Carga vírica del TDAV y función de las enzimas hepáticas en animales inoculados experimentalmente con la antitoxina 2. (A) Cuantificación mediante una qRT-PCR del ARN del TDAV. (B-E) Pruebas bioquímicas de la transaminasa de aspartato (AST), la transferasa de gamma glutamilo (GGT), la deshidrogenasa de sorbitol (SDH) y la deshidrogenasa de glutamato (GLDH o GD). Se tomaron muestras en el tiempo 0 y 10-14 semanas después de la inoculación con 500 ml del mismo lote de la antitoxina 2 relacionado con el brote epidémico de hepatitis sérica. Un caballo apareció levemente sintomático en la semana 9 después de la inoculación (el Caballo C1, negro), mientras que los otros tres no lo hicieron (el Caballo C2, gris claro; el Caballo C3, gris; y el Caballo C4, gris oscuro).

Figura 7. El TDAV puede provocar una infección crónica. Se monitorizó el TDAV en muestras emparejadas recogidas durante el brote epidémico y aproximadamente un año después. Los ciclos hasta el umbral (C_t) del ensayo diagnóstico del TDAV mediante una qRT-PCR (cebadores EVT-146/147) están representados gráficamente en un eje y invertido; un menor valor de C_t representa una mayor carga vírica. Los ensayos diagnósticos se llevaron a cabo en paralelo sobre muestras emparejadas, permitiendo una comparación directa de los valores de C_t .

Figura 8. Se analizaron treinta y cinco secuencias de alta calidad de los clones RACE para determinar el verdadero extremo 5' del genoma del TDAV. Se identificaron tramos de poliguanina (o de policitosina para los clones con la orientación inversa) generados durante el procedimiento de RACE en 5' que preceden al supuesto extremo 5' del genoma, y se eliminaron. Se incluyeron las posiciones 1-7 (marcadas) en el conjunto como la secuencia consenso, TGATACC, mientras que la posición marcada con '?' representa un potencial T polimorfo observado en cinco clones. Se generó el logo de la secuencia usando WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu>).

Figura 9. Estructuras predichas para la UTR en 5' y la UTR en 3'. La estructura secundaria del ARN para las secuencias (A) UTR en 5' y (B) UTR en 3' se predijo usando CONTRAfold y se visualizó usando Pseudo Viewer3. Se plegaron aproximadamente 30 nucleótidos secuencia abajo del codón de inicio de la traducción ('AUG', en negrita en (A)) y 30 nucleótidos secuencia arriba del codón de detención de la traducción ('UGA', en negrita en (B)), además de las UTR. Las coordenadas de (B) son relativas y están desplazadas en 10.154 nt (posición 1 = nt 10155 del TDAV; posición 325 = nt 10479 del TDAV).

Descripción detallada

Esta divulgación se refiere a soluciones para la actual e insatisfecha necesidad de identificación y detección del (los) agente(s) causal(es) de enfermedades tales como la enfermedad de Theiler. Según se describe en el presente documento, se ha identificado un posible agente causal como el virus asociado a la enfermedad de Theiler (el TDAV, que puede incluir, por ejemplo, "virus del tipo TDAV"), así como cepas clínicas y composiciones de los mismos. Adicionalmente se proporcionan secuencias de ácidos nucleicos y secuencias de aminoácidos que representan a los mismos (por ejemplo, las SEQ ID NOS.: 1-3). También se proporcionan las moléculas de ácidos nucleicos que comprenden dichas secuencias de ácidos nucleicos y/o que codifican dichas secuencias de aminoácidos. En el presente documento también se proporcionan los procedimientos y los reactivos para la detección del TDAV (que también pueden incluir virus de tipo TDAV), en una muestra (por ejemplo, una muestra biológica tal como sangre completa (por ejemplo, sin diluir o procesada), sangre de cordón umbilical, plasma, suero, suero de cordón umbilical, saliva, linfa, líquido cefalorraquídeo, orina, semen, líquido pleural, leche materna, sudor, ascitis, una muestra de tejido, un producto alimenticio (por ejemplo, carne), una bebida (por ejemplo, leche), etc.) y/o un organismo (por

ejemplo, un insecto). Por ejemplo, el virus el TDAV puede estar presente en una muestra biológica de un animal (por ejemplo, un mamífero) tal como un caballo. Dicho caballo (por ejemplo, uno que presenta la enfermedad de Theiler) puede tener el TDAV circulando en un líquido corporal tal como, por ejemplo, la sangre. En algunas realizaciones, el TDAV (por ejemplo, un virus que comparte al menos una cierta identidad con el descrito en el presente documento) puede ser identificado y/o detectado mediante la detección y/o el aislamiento del virus o de una porción del mismo a partir de una muestra biológica. En algunas realizaciones, el TDAV puede ser detectado mediante la detección de una secuencia de ácidos nucleicos y/o de una secuencia de aminoácidos del virus, y/o el virus *per se* (por ejemplo, en forma de un virus intacto o de una partícula vírica) en la muestra biológica. También se contemplan otras realizaciones, como será evidente para el experto habitual en la materia de esta divulgación.

El TDAV comprende normalmente una cualquiera o más secuencias de ácidos nucleicos y/o de aminoácidos que se corresponden con, que pueden usarse para identificar y/o para distinguir el TDAV de otro virus, y/o que pueden usarse para detectar el TDAV en una muestra (por ejemplo, una muestra biológica) y/o que pueden usarse para generar un anticuerpo reactivo frente al TDAV, tal como, por ejemplo: la SEQ ID NO.: 1 o 2; una secuencia de ácidos nucleicos que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 90 % con la SEQ ID NO.: 1 o 2; una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la SEQ ID NO.: 3; una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido o un péptido que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 90 % con la SEQ ID NO.: 3; un polipéptido que comprende la SEQ ID NO.: 3; un polipéptido que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 90 % con la SEQ ID NO.: 3. Algunas porciones de la SEQ ID NO.: 1, 2 o 3 pueden ser, por ejemplo, cualquier secuencia de nucleótidos (por ejemplo, un oligonucleótido) y/o una secuencia de aminoácidos (por ejemplo, un péptido o cualquier secuencia de aminoácidos a la que se une un agente de unión (por ejemplo, un anticuerpo)) con cualquier cantidad de restos de nucleótidos y/o de aminoácidos que es específica del TDAV, y que puede usarse para identificar el TDAV, y/o que puede usarse para diferenciar el TDAV, por ejemplo, de otro virus, por ejemplo, en una muestra biológica (por ejemplo, usando un ensayo). La secuencia de estas secuencias de ácidos nucleicos puede ser determinada mediante cualquier procedimiento disponible para los expertos habituales en la materia. Cualquiera de dichas secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos puede ser "única para el virus asociado a la enfermedad de Theiler (TDAV)". "Usado para identificar" puede incluir el uso de la unión de un agente de unión que tiene especificidad por una secuencia de nucleótidos y/o de aminoácidos del TDAV descrito en el presente documento. Un virus que comprende cualquiera de dichas secuencias de nucleótidos (por ejemplo, en el genoma vírico) y/o de aminoácidos (por ejemplo, expresadas por el virus) descrito en el presente documento y/o la unión a un agente de unión que tiene especificidad por el mismo, puede denominarse en el presente documento un virus "de tipo TDAV". En algunos casos, en el presente documento, "TDAV" y "de tipo TDAV" pueden usarse de forma intercambiable. Los ensayos para la identificación del TDAV (por ejemplo, en un producto) pueden llevarse a cabo de cualquier forma establecida en el presente documento o que esté disponible de otro modo para el experto habitual en la materia. Por ejemplo, el ensayo puede incluir el uso de uno o más oligonucleótidos, par(es) de cebador(es), procedimiento(s), kit(s), soporte(s) sólido(s) y/o anticuerpos descritos en el presente documento. También se contemplan otras realizaciones de dichos productos, como será evidente para el experto habitual en la materia de esta divulgación.

Según se describe en el presente documento, la enfermedad de Theiler se ha asociado con la administración previa de productos biológicos de origen equino (por ejemplo, antitoxina botulínica, antitoxina tetánica, antitoxinas de serpiente, preparaciones de antitimocitos, productos de calostro en general, y similares). Por lo tanto, es importante la producción de productos que se sepa que no contienen un agente infeccioso que pueda causar la enfermedad de Theiler. Los reactivos y los procedimientos descritos en el presente documento proveen al experto habitual en la materia para llevar a cabo dichas determinaciones. Consecuentemente, usando los reactivos y los procedimientos descritos en el presente documento (por ejemplo, los ensayos para la detección del TDAV), se puede proporcionar un producto (por ejemplo, un producto biológico de origen equino tal como antitoxina botulínica o antitoxina tetánica) que ha sido cribado y/o ensayado para evaluar la presencia del virus asociado a la enfermedad de Theiler en el mismo. En ciertas realizaciones, el producto puede derivar de suero o de plasma (por ejemplo, suero o plasma de caballo). El producto, por ejemplo, puede ser uno que se ha cribado y/o ensayado para detectar la presencia del TDAV. Un "producto ensayado" preferido, por ejemplo, puede ser aquel que se ha determinado que no contiene el TDAV y/o que contiene menos TDAV el producto original.

El TDAV puede ser detectado en forma de una partícula vírica *per se* o de una porción de la misma (por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos y/o un antígeno) usando cualquiera de las diversas técnicas bien conocidas. Una partícula vírica puede ser detectada, por ejemplo, mediante la observación directa del virus (por ejemplo, mediante una microscopía electrónica), mediante la detección de las células que expresan un antígeno del virus (por ejemplo, mediante una tinción y/o una citometría de flujo) y/o mediante la detección de una molécula de un ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos objetivo) correspondiente al virus. También hay disponibles para los expertos habituales en la materia otras técnicas para la detección del TDAV en una muestra, y están contempladas en el presente documento.

Las secuencias de ácidos nucleicos del TDAV (y/o los oligonucleótidos usados para la identificación y/o la detección de dichas secuencias de ácidos nucleicos) pueden incluir aquellas que hibridan (por ejemplo, en unas condiciones muy rigurosas y/o moderadamente rigurosas) con una sonda de hibridación que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la SEQ ID NO.: 3, tal como las SEQ ID NOS.: 1 o 2 (o un complemento de las mismas). La porción de hibridación del ácido nucleico de hibridación, tal como un oligonucleótido, normalmente tiene una longitud de al menos aproximadamente 18, 19, 20 nucleótidos. La porción de hibridación normalmente es

idéntica en al menos aproximadamente un 90 %, un 95 %, un 95-99 %, un 97,5 %, un 99 % o un 100 % a la secuencia de nucleótidos con la que hibrida. Los ácidos nucleicos de hibridación son útiles, por ejemplo, como sondas de clonación, cebadores (por ejemplo, un cebador para una PCR) y/o sondas diagnósticas. La estabilidad del ácido nucleico dúplex o híbrido es expresada en forma de la temperatura de fusión o T_m , que es la temperatura a la cual la sonda se disocia de un ADN objetivo. Esta temperatura de fusión se usa normalmente para definir las condiciones de rigurosidad requeridas. Si se identifican secuencias que están relacionadas y son sustancialmente idénticas a la sonda, en lugar de idénticas, entonces es útil establecer en primer lugar la menor temperatura a la cual únicamente se produce una hibridación homóloga con una concentración en particular de sal (por ejemplo, SSC o SSPE). Asumiendo que un malapareamiento de un 1 % da como resultado una disminución de 1 °C en la T_m , la temperatura del lavado final en la reacción de hibridación se reduce consecuentemente (por ejemplo, si se aspira a unas secuencias que tengan una identidad mayor del 95 %, la temperatura del lavado final se reduce en 5 °C). En la práctica, el cambio en la T_m puede ser de entre 0,5 y 1,5 °C por 1 % de malapareamiento. Unas condiciones muy rigurosas pueden implicar una hibridación a 68 °C en 5X de SSC/5X de solución de Denhardt/1,0 % de SDS, y un lavado con 0,2X de SSC/0,1 % de SDS a la temperatura ambiente. Unas condiciones moderadamente rigurosas pueden incluir un lavado con 3X de SSC a 42 °C. Las concentraciones salinas y las temperaturas pueden modificarse para conseguir el nivel de identidad óptimo entre la sonda y el ácido nucleico objetivo. Una guía adicional relativa a dichas condiciones está fácilmente disponible en la materia, por ejemplo, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Tercera Edición, de Sambrook et al., Cold Spring Harbor Press, 2001.

Una secuencia de ácidos nucleicos que se corresponde (por ejemplo, que comparte al menos una cierta identidad con) con el TDAV también puede ser un "ácido nucleico objetivo" y/o una "secuencia de ácidos nucleicos objetivo" (términos que pueden usarse de forma intercambiable). Una secuencia de ácidos nucleicos objetivo puede ser detectada y/o identificada y/o cuantificada mediante cualquiera de las diversas técnicas ampliamente disponibles en la materia. La secuencia de ácidos nucleicos objetivo se puede corresponder, por ejemplo, con la SEQ ID NO.: 1 y/o codificar 18, 19, 20 o más restos de aminoácidos consecutivos codificados por la misma (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos codificada por los nucleótidos 618-10.479 de la SEQ ID NO.: 1 (incluyendo el codón de detención GTG) y/o como en la SEQ ID NO.: 2)) y/o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos objetivo puede ser complementaria en al menos aproximadamente un 90 %, un 95 %, un 95-99 %, un 97,5 %, un 99 % o un 100 % (por ejemplo, idéntica a, o capaz de unirse, por ejemplo, en unas condiciones de hibridación rigurosas de ácidos nucleicos) a una porción de, o a lo largo de la totalidad de, la secuencia de ácidos nucleicos del TDAV (por ejemplo, la SEQ ID NO.: 1). La secuencia de ácidos nucleicos objetivo puede comprender una región (por ejemplo, una "región específica objetivo") es decir, por ejemplo, de aproximadamente 20-25, de aproximadamente 25-30, de aproximadamente 30-35, de aproximadamente 35-40, de aproximadamente 40-45, de aproximadamente 45-50 o más nucleótidos de longitud.

La secuencia de ácidos nucleicos objetivo puede ser de cualquier tipo, tal como, por ejemplo, un ARN mono- o bicatenario, un ADN o un híbrido de ARN/ADN, por ejemplo. En algunas realizaciones, el ácido nucleico objetivo puede estar contenido en un ARN (por ejemplo, como en el caso del análisis simultáneo de la expresión génica mediante una RT-PCR) o una molécula de ADN (por ejemplo, de ADNc). La preparación del ácido nucleico objetivo puede llevarse a cabo de una forma apropiada para el proceso de detección en particular que se va a implementar, como será conocido por los expertos habituales en la materia. Por ejemplo, las moléculas de un ácido nucleico de ADN o de ARN pueden ser extraídas a partir de cualquier tipo de muestra (por ejemplo, de sangre) y procesadas según los procedimientos habituales. Normalmente, la detección implica el uso de ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido (por ejemplo, una sonda)) que hibrida con y/o que puede usarse para amplificar (por ejemplo, es específica para) una secuencia de ácidos nucleicos objetivo. En algunas realizaciones, pueden usarse 1-1.000 oligonucleótidos diferentes (por ejemplo, cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11-50, 51-100, 101-150, 151-200, 201-250, 251-300, 301-350, 351-400, 401-450, 451-500, 501-550, 551-600, 601-650, 651-700, 701-750, 751-800, 801-850, 851-900, 901-950 o 951-1.000 oligonucleótidos) por separado o conjuntamente en una única o en múltiples reacciones para la detección y/o la identificación y/o la detección de una o más secuencias de ácidos nucleicos objetivo en una muestra. De forma adecuada, las técnicas de detección ejemplares pueden incluir una inmunotransferencia northern y/o una reacción en cadena de la polimerasa y/o variaciones de las mismas. También pueden utilizarse otras técnicas como puede describirse en el presente documento o en cualquier otra parte.

Una técnica usada habitualmente para la detección de ácidos nucleicos implica la amplificación de uno o más ácidos nucleicos objetivo (que puede incluir también, o no, uno o más ácidos nucleicos no objetivo) antes de la detección y/o de la identificación. Puede usarse cualquier procedimiento de amplificación y/o de detección. El procedimiento usado para la amplificación del (los) ácido(s) nucleico(s) objetivo puede elegirse entre uno cualquiera o más de los procedimientos disponibles para el experto en la materia, incluyendo, pero no se limita a, procedimientos lineales, logarítmicos y/o cualquier otro procedimiento de amplificación. Mientras que el término "amplificación" normalmente se refiere a un aumento "exponencial" en el ácido nucleico objetivo (por ejemplo, como en una reacción en cadena de la polimerasa ("PCR")), el término puede usarse en el presente documento para describir aumentos tanto lineales como exponenciales en la cantidad de la(s) secuencia(s) de ácido(s) nucleico(s) objetivo. El término "mezcla de reacción de amplificación" normalmente se refiere a una solución acuosa que comprende los diversos activos usados para la amplificación de la(s) secuencia(s) de ácido(s) nucleico(s) objetivo, tal como, por ejemplo, enzima(s), tampón(es) acuoso(s), sal(es), oligonucleótido(s) (por ejemplo, cebador(es) de amplificación), el ácido nucleico objetivo y trifosfatos de nucleósidos. Dependiendo del contexto, la mezcla puede ser una mezcla de reacción de

- amplificación completa o incompleta. Algunos procedimientos ejemplares incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. n° 4.683.202; 4.683.195; 4.965.188; y/o 5.035.996), procedimientos isotérmicos (usando una o más polimerasas de ARN (véase, por ejemplo, el documento WO 2006/081222)), desplazamiento de hebra (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n° RE39007E), destrucción parcial de las moléculas del cebador (véase, por ejemplo, el documento WO2006087574)), reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véase, por ejemplo, Wu, et al., Genomics 4: 560-569 (1990) y/o Barany, et al. PNAS USA 88: 189-193 (1991)), sistemas de replicasa Q β de ARN (véase, por ejemplo, el documento WO/1994/016108), sistemas basados en la transcripción del ARN (por ejemplo, TAS, 3SR), amplificación en círculos rotatorios (RCA) (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n° 5.854.033; la publicación de EE.UU. n° 2004/265897; Lizardi et al. Nat.Genet. 19: 225-232 (1998); y/o Banér et al. Nucleic Acid Res., 26: 5073-5078 (1998)) y/o una amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) (Little, et al. Clin Chem 45: 777-784 (1999)), entre otros. En algunas realizaciones, tal como mientras se lleva a cabo una PCR, la temperatura de fusión (por ejemplo, la T_m) de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo (o de una región de la misma, por ejemplo, una "región específica objetivo") puede estar aproximadamente 5 °C por debajo de la temperatura de apareamiento / extensión usada para los ciclos de la PCR. En algunas realizaciones, la T_m de la región específica objetivo puede variar entre aproximadamente 51 °C y 60 °C, entre aproximadamente 52 °C y 59 °C, entre aproximadamente 53 °C y 58 °C, entre aproximadamente 54 °C y 57 °C, entre aproximadamente 55 °C y 56 °C o entre aproximadamente 50 °C y aproximadamente 60 °C. Hay muchos sistemas que son adecuados para su uso en la aplicación de secuencias de ácidos nucleicos objetivo, y están contemplados en el presente documento, como comprenderá el experto en la materia.
- En algunas realizaciones, la amplificación puede llevarse a cabo mediante la formación de una mezcla de reacción que contiene la muestra biológica que comprende el ácido nucleico del TDAV (o, por ejemplo, un ácido nucleico objetivo del mismo), una molécula de un ácido nucleico, tal como un plásmido y/o un oligonucleótido (que comprende opcionalmente un marcador detectable) que se corresponde con el TDAV, y otros reactivos que puedan ser necesarios (por ejemplo, tampones, enzimas (por ejemplo, polimerasa)) para la amplificación y/o la detección y/o la identificación y/o la cuantificación del ácido nucleico objetivo. En algunas realizaciones, estos procedimientos pueden implicar el aislamiento y/o la amplificación del ácido nucleico objetivo, y la detección del mismo usando una sonda oligonucleotídica (por ejemplo, un oligonucleótido que se corresponde con la secuencia de nucleótidos del virus de tipo TDAV descrito en el presente documento). Por ejemplo, para una reacción de PCR, un par de cebadores (un cebador "directo" y uno "inverso") tales como:
- AGGTTCTTCGGGTAATCC (EVT-146; SEQ ID NO.: 4) y CCCTCGGACTGAATTATAGGC (EVT-147; SEQ ID NO.: 5) para producir un amplicón de 166 pares de bases (por ejemplo, correspondiente a los nucleótidos 171-336 de la SEQ ID NO.: 1);
- GCTTCCCTTGC ACTATGG (EVT-154; SEQ ID NO.: 6) y CAAGCCGATGCAACTAAAGC (EVT-155; SEQ ID NO.: 7) para producir un amplicón de 156 pares de bases (por ejemplo, correspondiente a los nucleótidos 1674-1829 de la SEQ ID NO.: 1);
- ATGCCATGGGTATGTTGACC (EVT-162; SEQ ID NO.: 10) y CTCCTCGTAGTTGCCTTTGC (EVT-163; SEQ ID NO.: 11) para producir un amplicón de 155 pares de bases (por ejemplo, correspondiente a los nucleótidos 3892-4046 de la SEQ ID NO.: 1);
- CTCCTGTGCTCCCTGAACC (EVT-178; SEQ ID NO.: 16) y AACACCATTGACCCAGAAGC (EVT-179; SEQ ID NO.: 17) para producir un amplicón de 167 pares de bases (por ejemplo, correspondiente a los nucleótidos 7834-8000 de la SEQ ID NO.: 1); o
- CTTCTGCCTACATCCCATCG (EVT-186; SEQ ID NO.: 18) y TGCATACCTTTCGGCTAAGG (EVT-187; SEQ ID NO.: 19) para producir un amplicón de 197 pares de bases (por ejemplo, correspondiente a los nucleótidos 9931-10127 de la SEQ ID NO.: 1).
- Otros pares de cebadores potencialmente útiles que pueden incluir:
- GGCTCTTTGGATTCACTTGC (EVT-158; SEQ ID NO.: 8) y CCAGTGACCAGCATAATTCG (EVT-159; SEQ ID NO.: 9) para producir un amplicón de 166 pares de bases (por ejemplo, correspondiente a los nucleótidos 2144-2309 de la SEQ ID NO.: 1);
- TGGGAGTGTCTGGATTATTGC (EVT-170; SEQ ID NO.: 12) y CAAGGTGTCCGAGAGGTAGG (EVT-171; SEQ ID NO.: 13) para producir un amplicón de 178 pares de bases (por ejemplo, correspondiente a los nucleótidos 5607-5784 de la SEQ ID NO.: 1); o,
- TGGTACTGGTACCGTCACTGG (EVT-174; SEQ ID NO.: 14) y GCGAGGACCTGAAGTAGTGC (EVT-175; SEQ ID NO.: 15) para producir un amplicón de 163 pares de bases (por ejemplo, correspondiente a los nucleótidos 6572-6734 de la SEQ ID NO.: 1).
- También pueden ser útiles otros pares de cebadores correspondientes a las SEQ ID NO.: 1 y/o que codifiquen una porción de la SEQ ID NO.: 2. Dichos pares de cebadores pueden usarse en reacciones de amplificación, según se describe en el presente documento y/o como es conocido en la materia. Cualquiera de estos cebadores pueden

usarse, también o como alternativa, solos o junto con cualquier otro de dichos cebadores en otras reacciones de detección (por ejemplo, en forma de sondas oligonucleotídicas). Por lo tanto, una secuencia de ácidos nucleicos objetivo también puede ser idéntica a, ser similar a, comprender y/o corresponderse con cualquiera de las SEQ ID NOS.: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19. Las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO.: 1 o 2 correspondiente a cualquiera de los cebadores y/o de los amplicones mencionados anteriormente puede servir asimismo como ácidos nucleicos objetivo para otros ensayos. Por lo tanto, un ácido nucleico objetivo puede comprender y/o corresponderse con los nucleótidos 171-336 de la SEQ ID NO.: 1 (SEQ ID NO.: 28); los nucleótidos 1674-1829 de la SEQ ID NO.: 1 (SEQ ID NO.: 29); los nucleótidos 2144-2309 de la SEQ ID NO.: 1 (SEQ ID NO.: 30); los nucleótidos 3892-4046 de la SEQ ID NO.: 1 (SEQ ID NO.: 31); los nucleótidos 5607-5784 de la SEQ ID NO.: 1 (SEQ ID NO.: 32); los nucleótidos 6572-6734 de la SEQ ID NO.: 1 (SEQ ID NO.: 33); los nucleótidos 7834-8000 de la SEQ ID NO.: 1 (SEQ ID NO.: 34); o los nucleótidos 9931-10127 de la SEQ ID NO.: 1 (SEQ ID NO.: 35), como se muestra a continuación:

SEQ ID NO.: 28

AGGGTTCTTCGGGTAAATCCCGGCGCGGTGTTTTGGGTTTCAGGGCAGTA
GGGGCAGACGGGCCAGCAGTCGCTGGTTCCTGGTACCACCACCCTATCC
GGACGACCTCCCTCACGAAAGGTCGCCACGGTCTGTGGCTCGACGACGC
CTATAATTCAGTCCGAGGG;

15 SEQ ID NO.: 29

GCTTTCCTTTGCACTATGGTCAGAAATCTACTGTTGCTTTGGCTACTA
AAATGGTCTTGACTGCTAAATTACAACCCTTGTGGAGGAATCTTAACAC
TACCATTATGTGCTCAGTTATTCGGACTTCTGTCCATTGCTTTAGTTGC
ATCGGCTTG;

SEQ ID NO.: 30

GGCTCTTTGGATTCACTTGCAGGGGGGGGTCTTTGGATCCCCACTCCG
ATACCTGGCTGCAAAAATAAGAATGAAGCCATCCACAACACTACACACACT
GTGTCCAGGCTCTTGGTCACGCCATTAGCGTGGTTGGTGAGGCGAGTGC
GAATTATGCTGGTCACTGG;

SEQ ID NO.: 31

ATGCCATGGGTATGTTGACCGCGGTGTCGCATCGGGGGCCGGAAGTACA
CTCGGCCCTCTTTGTCAAGCCGTGGGACAGCGTTCCCAGGGATGCCCAA
ACGGTTACGGACGTGGGTGCACCTCCTGCGGTACCTGGCAAAGGCAACT
ACGAGGAG;

20 SEQ ID NO.: 32

TGGGAGTGTCTGGATTATTGCTACCGGGTAGCGACCGGTACCCTGGCTC
CTAGAACC GCCGACGCGCTGGAAAGCGGGGCGGTTGGCTTCGGGAGGC
GTGCTGTGGGACTAACCTCCCAGTCCATTCCCAGGTGGGTGGGGG
GTCACCCAACCCCTACCTCTCGGACACCTTG;

SEQ ID NO.: 33

TGGTACTGGTACCGTCACTGGCCGTTGCGGCTGTGGCGCTGCCATCTCT
GCTGACTTCGAGGAGGGTGTTCGCGTTCGCTGGCACACTACTTCATATT
TCTGCCGTGGGTACTTTGCCCGCGGCATTCTCTGAATACTCTTGGCAC
TACTTCAGGTCCTCGC;

o

25 SEQ ID NO.: 35

CTTCTGCCTACATCCCATCGTTGGAGGTTGACACCTTCGACGCAACCCA
 GCTTTTGGACATTATGAGCAGGCCCTATAACAACCTTGAGCTCCAGATT
 GGCAAGCCGATTCGTCGGTCGCTGACTGGACTCTTTGTGTCTAGGATCT
 GTTCTTTTTTTGGTTCTGACATTCCTGCTACCTTAGCCGAAAGGTATGC
 A.

También pueden ser adecuadas las variantes de dichos ácidos nucleicos objetivo, al igual que otros ácidos nucleicos objetivo que se correspondan con el TDAV.

5 En algunas realizaciones, los procedimientos pueden implicar la preparación de una muestra de ARN y el procesado de la misma usando una técnica de inmunotransferencia northern en la que el ácido nucleico objetivo es detectado usando una sonda oligonucleotídica que puede incluir un marcador detectable. Una sonda adecuada en una reacción de inmunotransferencia northern puede incluir cualquiera correspondiente al TDAV, tal como, por ejemplo, la SEQ ID NO.: 3, que puede incluir un marcador detectable. Los tipos y/o la cantidad de muestra del ácido nucleico y/o del cebador y/o de la sonda, usados en dichas reacciones, pueden variar, como comprenderá el experto habitual en la materia. Por ejemplo, una reacción de amplificación puede llevarse a cabo usando una polimerasa de ácido nucleico (por ejemplo, la polimerasa Taq), al menos un cebador oligonucleotídico capaz de hibridar específicamente con un polinucleótido objetivo (normalmente dos oligonucleótidos, como se usarían en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR)) y, opcionalmente, al menos una sonda oligonucleotídica detectable (directa o indirectamente) que hibrida con el ácido nucleico objetivo amplificado. Puede incorporarse un marcador detectable y/o una sonda, por ejemplo, en el al menos un cebador y/o una sonda oligonucleotídica. En algunas realizaciones, al menos también puede introducirse un agente de unión al ácido nucleico detectable (por ejemplo, un colorante intercalante o no intercalante) antes, durante o después de la amplificación. Puede usarse cualquiera de estos u otros procedimientos para detectar el TDAV en una muestra, como comprendería el experto habitual en la materia.

20 La(s) anterior(es) sonda(s) oligonucleotídica(s) descrita(s) puede(n) contener una marcador detectable que proporciona una señal que puede ser monitorizada para averiguar si se ha amplificado la secuencia de ácidos nucleicos objetivo. Pueden usarse muchos reactivos, sistemas y/o etiquetas detectables diferentes en los métodos descritos en el presente documento. Estos incluyen, por ejemplo, los sistemas TaqMan®, los sistemas de marcador detectable-inactivador (por ejemplo, los sistemas FRET, salicilato / ligando DTPA (véase, por ejemplo, Oser et al. Angew. Chem. Int. Engl. 29 (10): 1167 (1990), hibridación por desplazamiento, sondas homólogas, los ensayos descritos en el documento EP 070685), balizas moleculares (por ejemplo, NASBA, Scorpion, bases de ácidos nucleicos bloqueadas (LNA) (Singh, et al. Chem Commum 4: 455-456 (1998)), sondas de ácidos nucleicos peptídicos (PNA) (Pellestor, et al. European J. Human Gen. 12: 694-700 (2004)), sondas Eclipse (Afonina, et al. Biotechniques 32: 940-949 (2002)), sondas *light-up* (Svanvik, et al. Anal Biochem 281: 26-35 (2001)), balizas moleculares (Tyagi, et al. Nat. Biotechnol. 14: 303-308 (1996)), balizas moleculares tripartitas (Nutiu, et al. Nucleic Acids Res. 30: e94 (2002)), QuantiProbes (www.qiagen.com), HyBeacons (French, et al. Mol. Cell. Probes 15: 363-374 (2001)), sondas de desplazamiento (Li, et al. Nucleic Acids Res. 30: e5 (2002)), HybProbes (Cardullo, et al. PNAS 85: 8790-8794 (1988)), MGB Alert (www.nanogen.com), Q-PNA (Fiandaca, et al. Genome Res. 11: 609-611 (2001)), Plexor (www.Promega.com), cebadores LUX (Nazarenko, et al. Nucleic Acids Res. 30: e37 (2002)), cebadores Scorpion (Whitcombe, et al. Nat Biotechnol 17: 804-807 (1999)), cebadores AmpliFluor (Sunrise (Nazarenko, et al. Nucleic Acids Res. 25: 2516-2521 (1997)), cebadores DzyNA (Todd, et al. Clin. Chem. 46: 625-630 (2000)), y similares. En cada uno de estos ensayos, la generación de los productos de la amplificación puede ser monitorizada mientras está progresando la reacción. Puede usarse un aparato para detectar la señal generada por el marcador detectable para la detección, la medición y la cuantificación de la señal antes, durante y/o después de la amplificación. El tipo de señal en particular puede dictar la elección del procedimiento de detección. Por ejemplo, en algunas realizaciones se usan colorantes fluorescentes para marcar las sondas y/o los productos amplificados. Las sondas pueden unirse a productos amplificados monocatenarios y/o bicatenarios, y/o intercalar los colorantes en los productos bicatenarios amplificados, y consecuentemente, la fluorescencia resultante aumenta al aumentar la cantidad de producto amplificado. En algunas realizaciones, la T_m puede determinarse observando la disminución de la fluorescencia según se disocia el producto bicatenario amplificado y se libera el colorante intercalado en el mismo. La cantidad de fluorescencia puede cuantificarse usando un equipo habitual, tal como un espectrofluorímetro, por ejemplo. También pueden unirse uno o más marcadores detectables y/o agentes de inactivación a un cebador o a una sonda. El marcador detectable puede emitir una señal cuando esté libre o unido a un ácido nucleico objetivo. El marcador detectable también puede emitir una señal cuando esté en las proximidades de otro marcador detectable. También pueden usarse marcadores detectables con moléculas inactivadoras, de tal forma que la señal solo sea detectable cuando no está en una proximidad lo suficientemente estrecha de la molécula inactivadora. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sistema de ensayo puede provocar que el marcador detectable sea liberado de la molécula inactivadora. Puede usarse uno cualquiera o más de dichos marcadores detectables para marcar y/o detectar los cebadores y/o las sondas usados en los métodos descritos en el presente documento. Como se ha mencionado anteriormente, en algunas realizaciones el marcador detectable puede estar unido a una sonda, que puede estar incorporada en un cebador, o puede de otro modo unirse a un ácido nucleico objetivo amplificado (por ejemplo, un agente de unión a un ácido nucleico detectable, tal como un colorante intercalante o no intercalante). En algunas realizaciones, la sonda es un oligonucleótido que hibrida con un ácido nucleico objetivo en 3' con respecto al, al menos un, cebador. En algunas realizaciones, la polimerasa tiene actividad

de nucleasa (por ejemplo, en 5'-3') para liberar la sonda del ácido nucleico amplificado. En algunas realizaciones, la liberación del ácido nucleico amplificado hace que la sonda sea detectable. En algunas realizaciones, la sonda puede tener un marcador detectable y una molécula inactivadora que inactiva el marcador detectable cuando está libre pero que no lo inactiva cuando la sonda está hibridada con el ácido nucleico amplificado. En algunas realizaciones, pueden usarse dos o más sondas cuando al menos una sonda tiene un marcador detectable y al menos otra sonda tiene una molécula inactivadora. Cuando están en una proximidad suficientemente estrecha entre sí, la molécula inactivadora normalmente suprime la señal del marcador detectable en la otra sonda. En algunas realizaciones, pueden usarse dos o más sondas, teniendo cada una un marcador detectable diferente, sin moléculas inactivadoras. En dichas realizaciones, las sondas pueden hacerse detectables (por ejemplo, *de novo* o mostrando una señal diferente que cualquier sonda sola) cuando están en una proximidad lo suficientemente cercana entre sí. Dichas reacciones también pueden combinarse con otras etapas de detección, tales como el análisis de la temperatura de fusión y similares. Cuando se usa más de un marcador detectable, cada uno debería diferir a sus propiedades espectrales de forma que los marcadores puedan distinguirse entre sí, o de forma que conjuntamente, los marcadores detectables emitan una señal que no es emitida por ninguno de los marcadores detectables por separado.

Algunos ejemplos de marcadores detectables incluyen, por ejemplo, un colorante fluorescente o un fluoróforo (por ejemplo, un grupo químico que puede ser excitado por la luz para emitir fluorescencia o fosforescencia), "colorantes aceptores" capaces de inactivar la señal fluorescente de un colorante donante fluorescente, y similares. Algunos marcadores detectables adecuados pueden incluir, por ejemplo, fluoresceínas (por ejemplo, 5-carboxi-2,7-diclorofluoresceína; 5-carboxifluoresceína (5-FAM); 5-HAT (hidroxitriptamina); 5-hidroxitriptamina (HAT); 6-JOE; 6-carboxifluoresceína (6-FAM); FITC); flúores Alexa (por ejemplo, 350, 405, 430, 488, 500, 514, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 635, 647, 660, 680, 700, 750); fluoróforos BODIPY (por ejemplo, 492/515, 493/503, 500/510, 505/515, 530/550, 542/563, 558/568, 564/570, 576/589, 581/591, 630/650-X, 650/665-X, 665/676, FL, FL ATP, FI-Ceramida, R6G SE, TMR, TMR-X conjugado, TMR-X, SE, TR, TR ATP, TR-X SE), cumarinas (por ejemplo, 7-amino-4-metilcumarina, AMC, AMCA, AMCA-S, AMCA-X, ABQ, CPM metilcumarina, cumarina faloidina, hidroxycumarina, CMFDA, metoxicumarina), calceína, calceína AM, calceína azul, colorantes de calcio (por ejemplo, crimson de calcio, verde de calcio, naranja de calcio, blanco de calcoflúor), colorantes de azul Cascade, amarillo Cascade; Cy™ (por ejemplo, 3, 3.18, 3.5, 5, 5.18, 5.5, 7), la GFP cian, un fluorosensor de AMP cíclico (FiCRhR), proteínas fluorescentes (por ejemplo, la proteína fluorescente verde (por ejemplo, GFP, EGFP), la proteína fluorescente azul (por ejemplo, BFP, EBFP, EBFP2, Azurita, mKalamal), la proteína fluorescente cian (por ejemplo, ECFP, Cerulean, CyPet), la proteína fluorescente amarilla (por ejemplo, YFP, Citrina, Venus, YPet), pares de donante/aceptor de FRET (por ejemplo, fluoresceína/tetrametilrodamina, IAEDANS/fluoresceína, EDANS/dabcilo, fluoresceína/fluoresceína, BODIPY FL/BODIPY FL, fluoresceína/QSY7 y QSY9), LysoTracker y LysoSensor (por ejemplo, LysoTracker Blue DND-22, LysoTracker Blue-White DPX, LysoTracker Yellow HCK-123, LysoTracker Green DND-26, LysoTracker Red DND-99, LysoSensor Blue DND-167, LysoSensor Green DND-189, LysoSensor Green DND-153, LysoSensor Yellow/Blue DND-160, LysoSensor Yellow/Blue dextrano de PM 10.000), verde Oregon (por ejemplo, 488, 488-X, 500, 514); rodaminas (por ejemplo, 110, 123, B, B 200, BB, BG, B extra, 5-carboxitetrametilrodamina (5-TAMRA), 5 GLD, 6-carboxirrodamina 6G, Lisamina, Lisamina Rodamina B, Falcidina, Faloidina, Red, Rhod-2, 5-ROX (carboxi-X-rodamina), Sulforrodamina B can C, Sulforrodamina G Extra, Tetrametilrodamina (TRITC), WT), rojo Texas, rojo Texas-X, VIC y otros marcadores descritos, por ejemplo, en la publicación de EE.UU. n° 2009/0197254), entre otros, como conocería el experto en la materia. También pueden usarse otros marcadores detectables (véase, por ejemplo, la publicación de EE.UU. n° 2009/0197254), como conocerían los expertos en la materia. También se contempla el uso de otros procedimientos y/o reactivos en el presente documento, como comprendería el experto en la materia.

Las enzimas polimerasas adecuadas para llevar a la práctica los procedimientos descritos en el presente documento son bien conocidas en la materia y pueden proceder de diversas fuentes. Por ejemplo, pueden obtenerse polimerasas termoestables a partir de diversas bacterias termófilas que están disponibles en el mercado (por ejemplo, en la American Type Culture Collection, Rockville, Md.) usando procedimientos que son bien conocidos por el experto habitual en la materia (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n° 6.245.533). Las células bacterianas pueden cultivarse según las técnicas microbiológicas habituales, usando unos medios de cultivo y unas condiciones de incubación adecuadas para el cultivo de cultivos activos de la especie en particular, que son bien conocidos por el experto habitual en la materia (Véase, por ejemplo, Brock, T. D. y Freeze, H., J. Bacteriol. 98 (1): 289-297 (1969); Oshima, T. y Imahori, K, Int. J. Syst. Bacteriol. 24 (1): 102-112 (1974)). Algunas fuentes adecuadas de polimerasas termoestables pueden incluir las bacterias termófilas *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus*, *Thermococcus litoralis*, *Pirococcus furiosus*, *Pirococcus woosii* y otras especies del género *Pirococcus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Sulfolobus ácidoacaldarius*, *Thermoplasma ácidoophilum*, *Thermus flavus*, *Thermus ruber*, *Thermus brockianus*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermotoga maritime* y otras especies del género *Thermotoga*, y *Metanobacterium thermoautotrophicum*, y mutantes de cada una de estas especies. Algunas polimerasas termoestables preferibles pueden incluir, pero no se limitan a, la polimerasa Taq de ADN, la polimerasa Tne de ADN, la polimerasa Tma de ADN, o mutantes, derivados o fragmentos de las mismas.

Algunas fuentes de ácidos nucleicos (por ejemplo, de ácidos nucleicos objetivo) de las composiciones, los procedimientos y/o los kits incluyen, pero no se limitan a, muestras biológicas (por ejemplo, de mamífero, que no son de mamífero) descritas en el presente documento. Por ejemplo, un tejido de mamífero, la sangre, las células

cultivadas y/u otras muestras de cultivo (por ejemplo, que contienen virus) también pueden ser fuentes adecuadas de los ácidos nucleicos de molde. Además, virus, bacteriófagos, bacterias, hongos y otros microorganismos pueden ser la fuente del ácido nucleico para su análisis. El ADN puede ser genómico o puede estar clonado en plásmidos, bacteriófagos, cromosomas bacterianos artificiales (BAC), cromosomas de levadura artificiales (YAC) u otros vectores. El ARN puede aislarse directamente a partir de las células pertinentes o puede ser producido mediante un cebado *in vitro* a partir de un promotor de ARN adecuado o mediante una transcripción *in vitro*. También pueden ser adecuadas otras fuentes, como comprendería el experto habitual en la materia.

Las moléculas de ácidos nucleicos correspondientes a y/o derivadas del y/o que codifican el TDAV y/o un antígeno (o un inmunógeno) del mismo también pueden estar contenidas en un vector (por ejemplo, un vector recombinante) tal como uno o más de vectores no víricos y/o víricos. Dicho vector puede ser utilizado para la administración de dichas moléculas de ácidos nucleicos (por ejemplo, a una célula *in vitro* o *in vivo*). Cuando dichos vectores se usan para inducir y/o para potenciar una respuesta inmunitaria, el vector también puede codificar otras proteínas (por ejemplo, moléculas coestimulantes, citocinas o quimiocinas) y/o combinarse con otros factores (por ejemplo, citocinas exógenas) (Xiang et al., *Immunity*, 2: 129-135, 1995; Kim et al., *Eur. J. Immunol.*, 28: 1089-1103, 1998; Iwasaki et al., *J. Immunol.* 158: 4591-3601, 1997; Sheerlinck et al., *Vaccine*, 19: 2647-2656, 2001). También pueden utilizarse otras estrategias para mejorar la eficacia de dichos sistemas de administración, que incluyen, por ejemplo, el uso de replicones víricos autorreplicantes (Caley et al., *Vaccine*, 17: 3124-2135, 1999; Dubensky et al., *Mol. Med.* 6: 723-732, 2000; Leitner et al., *Cancer Res.* 60: 51-55, 2000), optimización de codones (Liu et al., *Mol. Ther.*, 1: 497-500, 2000; Dubensky, *supra*; Huang, et al., *J. Virol.* 75: 4947-4951, 2001), electroporación *in vivo* (Widera et al., *J. Immunol.* 164: 4635-3640, 2000), incorporación de motivos estimulantes tales como CpG (Gurunathan, *supra*; Leitner, *supra*), secuencias para el direccionamiento a las rutas endocíticas o de procesamiento de la ubiquitina (Thomson et al., *J. Virol.* 72: 2246-2252, 1998; Velders et al., *J. Immunol.* 166: 5366-5373, 2001), regímenes de sensibilización y refuerzo (Gurunathan *supra*; Sullivan et al., *Nature* 408: 605-609, 2000; Hanke et al., *Vaccine*, 16: 439-445, 1998; Amara et al., *Science* 292: 69-74, 2001), sitios de escisión sensibles al proteasoma y el uso de una administración en las mucosas. Algunos vectores "no víricos" pueden incluir, por ejemplo, vectores de plásmidos (por ejemplo, compatibles con células hospedadoras bacterianas, de insecto y/o de mamífero). Algunos ejemplos de vectores pueden incluir, por ejemplo, PCR-ii, PCR3 y pADNc3.1 (Invitrogen, San Diego, CA), pBSii (Stratagene La Jolla, CA), pet15 (Novagen, Madison, WI), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), pEGFp- n2 (Clontech, Palo Alto, CA), pET1 (Bluebacii, Invitrogen), pDSR-alfa (publicación PCT n° WO 90/14363) y pFASTBACdual (Gibco-BRL, Grand island, NY) así como derivados del plásmido Bluescript® (un elevado número de copias del fagémido basado en COLel, Stratagene Cloning Systems La Jolla, CA), plásmidos de clonación de PCR diseñados para la clonación de los productos de la PCR amplificados mediante la TAQ (por ejemplo, el kit de clonación TOPO™ TA®, derivados del plásmido PCR2.1®, Invitrogen, Carlsbad, CA). También pueden usarse vectores bacterianos, que incluyen, por ejemplo, *Shigella*, *Salmonella* (por ejemplo, por una administración a las mucosas), *Vibrio cholerae*, *Lactobacillus*, *Bacille Calmette Guerin* (BCG) y *Streptococcus* (véase, por ejemplo, el documento WO 88/6626; el documento WO 90/0594; el documento WO 91/13157; el documento WO 92/1796; y el documento WO 92/21376). Los vectores pueden construirse usando las técnicas recombinantes habituales ampliamente disponibles para el experto en la materia. En la materia se conocen y pueden usarse otros muchos vectores de expresión y sistemas de plásmidos no víricos. Varios sectores víricos que han sido utilizados con éxito para la introducción de un ácido nucleico en un hospedador incluyen retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), virus herpes y poxvirus, entre otros. Los vectores víricos pueden construirse usando las técnicas recombinantes habituales ampliamente disponibles para el experto en la materia.

También pueden ser suficientes otras técnicas de administración, que incluyen, por ejemplo, complejos de ADN-ligando, complejos de adenovirus-ligando-ADN, inyección directa de ADN, precipitación con CaPO₄, técnicas de cañón de genes, electroporación y sistemas de dispersión coloidales. Algunos sistemas de dispersión coloidales incluyen complejos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. El sistema coloidal preferido es un liposoma, que son vesículas artificiales con membrana útiles como vehículos de administración *in vitro* e *in vivo*. Pueden encapsularse ARN, ADN y viriones intactos en el interior acuoso y ser administrados a las células en una forma biológicamente activa (Fraley, R. et al. *Trends Biochem. Sci.*, 6: 77, 1981). La composición del liposoma es habitualmente una combinación de fosfolípidos, particularmente fosfolípidos con una elevada temperatura de transición de fase, habitualmente junto con esteroides, especialmente colesterol. También pueden usarse otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes. Algunos ejemplos de lípidos útiles en liposomas incluyen, por ejemplo, compuestos de fosfatidilo, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos. Particularmente útiles son los diacilfosfatidilgliceroles, en los que la fracción lipídica contiene entre 14-18 átomos de carbono, particularmente entre 16-18 átomos de carbono, y está saturada. Algunos fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina.

Como comprenderían los expertos habituales en la materia, los procedimientos para la preparación y el uso de dichos vectores no víricos, vectores víricos y variaciones de los mismos, están disponibles en la materia. Por ejemplo, pueden encontrarse algunas técnicas útiles en referencias de biología molecular habituales tales como *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), *Gene*

Expression Technology (Methods in Enzymology, Vol. 185, editado por D. Goeddel, 1991. Academic Press, San Diego, CA) y PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis et al., 1990. Academic Press, San Diego, CA), por ejemplo.

5 Los polipéptidos del TDAV descritos en el presente documento pueden ser los mismos o similares a los específicos del TDAV (por ejemplo, la SEQ ID NO.: 3), y pueden contener y/o estar modificados para que contengan sustituciones que pueden considerarse, por ejemplo, conservativas o no conservativas. Una sustitución conservativa puede ser, por ejemplo, la sustitución de un tipo de resto de aminoácido por un tipo de resto de un aminoácido similar. Una sustitución no conservativa puede ser, por ejemplo, la sustitución de un tipo de resto de aminoácido por un tipo de resto de un aminoácido diferente. Los aminoácidos pueden ser similares entre sí, por ejemplo, si se basan en el tamaño, la hidrofobicidad, la polaridad, la alifaticidad (o no), la aromaticidad (o la ausencia de la misma), la carga (positiva o negativa) u otros atributos. Algunos ejemplos no limitantes y preferidos de sustituciones se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1. Sustituciones de aminoácidos

Restos originales	Ejemplos de sustituciones	Sustituciones preferidas
Ala	Val, Leu, He	Val
Arg	Lys, Gln, Asn, His	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
He	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	He
Lys	Arg, 1,4 Ácido diaminobutírico, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

15 También se desvela una célula cultivada que comprende moléculas de ácidos nucleicos correspondientes al y/o derivadas del y/o que codifican el TDAV y/o un antígeno (o un inmunógeno) del mismo. La célula cultivada puede ser transfectada y/o infectada por un vector o por la descendencia del mismo, de forma que puede expresar un polipéptido (por ejemplo, un antígeno). Las líneas celulares adecuadas son conocidas por los expertos en la materia y están disponibles en el mercado, por ejemplo, a través de colecciones de cultivo celular establecidas. Dichas células pueden usarse después para la producción de partículas víricas, de polipéptidos, de reactivos para la detección y/o el aislamiento del TDAV, o para otros usos. Un ejemplo de procedimiento puede comprender el cultivo de una célula que comprende la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, opcionalmente bajo el control de una secuencia de expresión) en unas condiciones que permitan la producción de partículas víricas o la expresión de un polipéptido. La partícula vírica, el polipéptido y/u otro reactivo puede aislarse después a partir de la célula o del medio de cultivo celular usando técnicas convencionales.

25 También se desvelan preparaciones y/o composiciones que comprenden ácidos nucleicos del TDAV (por ejemplo, contenidos en un vector), polipéptidos y/o péptidos correspondientes al mismo. Por ejemplo, una preparación o una composición puede comprender, por ejemplo, un ácido nucleico, un polipéptido y/o un péptido del TDAV en forma de una preparación o una composición parcialmente purificada (por ejemplo, con una pureza de aproximadamente cualquier del 50 %, el 60 %, el 75 %, el 90 %, el 95 % (por ejemplo, p/p)) o purificada (por ejemplo, de aproximadamente el 98-100 % (p/p)). Normalmente, dichas preparaciones incluyen un tampón tal como solución salina tamponada con fosfato o con tris (PBS o TBS, respectivamente). Las preparaciones también pueden

30

formularse para que contengan excipientes, como estabilizantes, por ejemplo.

En algunas realizaciones se proporcionan procedimientos para la detección de las células que comprenden partículas víricas del TDAV y/o antígenos del mismo usando los oligonucleótidos o los cebadores de la invención. En ciertas realizaciones, las células que expresan el (los) antígeno(s) del TDAV en la superficie de la célula de un animal (por ejemplo, un caballo) pueden ser detectadas poniendo en contacto una muestra biológica de prueba con un oligonucleótido y detectando el mismo unido a las células (por ejemplo, usando una citometría de flujo). En ciertas realizaciones, el procedimiento puede comprender la comparación entre la cantidad de unión de la muestra biológica de prueba o los componentes de la misma y la cantidad de unión de una muestra biológica de control o los componentes de la misma, en la que un aumento en la unión a la muestra biológica de prueba o los componentes de la misma con respecto a la muestra biológica de control o los componentes de la misma, indica la presencia de una célula de linfoma en la muestra biológica de prueba. En algunas realizaciones, la muestra biológica es sangre equina. Dichos procedimientos también se proporcionan en un formato *in vivo* y/o *in vitro*.

Para ayudar al artesano experto en el uso de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento, los mismos pueden proporcionarse en un formato de kit. En el presente documento también se proporciona un kit que incluye dichos ácidos nucleicos y opcionalmente otros componentes necesarios para el uso de los mismos para la detección del TDAV en una muestra biológica (por ejemplo, una célula o un fluido). Los ácidos nucleicos del kit pueden proporcionarse en cualquier forma adecuada, incluyendo congelados, liofilizados o en un tampón farmacéuticamente aceptable tal como TBS o PBS.

Como se ha descrito anteriormente, esta divulgación se refiere a la SEQ ID NO.: 1, 2 o 3. Esta divulgación se refiere, por ejemplo, a una secuencia de ácidos nucleicos aislada que comprende la SEQ ID NO.: 1 o 2; una secuencia de ácidos nucleicos aislada que tiene una identidad de al menos el 90 % con la SEQ ID NO.: 1 o 2 una secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica la SEQ ID NO.: 3; una secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 90 % con la SEQ ID NO.: 3; un polipéptido que comprende la SEQ ID NO.: 3; un polipéptido que tiene una identidad o similitud de al menos el 90 % con la SEQ ID NO.: 3; un oligonucleótido que tiene una secuencia de ácidos nucleicos hibridable en unas condiciones alta o moderadamente rigurosas con la SEQ ID NO.: 1 o 2; un oligonucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO.: 1, la SEQ ID NO.: 2, la SEQ ID NO.: 3, la SEQ ID NO.: 4, la SEQ ID NO.: 5, la SEQ ID NO.: 6, la SEQ ID NO.: 7, la SEQ ID NO.: 8, la SEQ ID NO.: 9, la SEQ ID NO.: 10, la SEQ ID NO.: 11, la SEQ ID NO.: 12, la SEQ ID NO.: 13, la SEQ ID NO.: 14, la SEQ ID NO.: 15, la SEQ ID NO.: 16, la SEQ ID NO.: 17, la SEQ ID NO.: 18 y la SEQ ID NO.: 19; dos o más oligonucleótidos para la amplificación de una secuencia de ácidos nucleicos de un virus (por ejemplo, el TDAV), comprendiendo cada oligonucleótido una secuencia de ácidos nucleicos correspondiente a al menos una porción de al menos 20 o más nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO.: 1 o 2, complementaria de una porción de al menos 20 o más nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO.: 1 o 2, o complementaria de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una porción de al menos 20 o más aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO.: 3, que comprende opcionalmente uno o más marcadores detectables; un par de cebadores seleccionado entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS.: 4 y 5; las SEQ ID NOS.: 6 y 7; las SEQ ID NOS.: 8 y 9; las SEQ ID NOS.: 10 y 11; las SEQ ID NOS.: 12 y 13; las SEQ ID NOS.: 14 y 15; las SEQ ID NOS.: 16 y 17; y las SEQ ID NOS.: 18 y 19, que opcionalmente comprende uno o más marcadores detectables; procedimientos para la detección y/o la identificación y/o la cuantificación de un virus (por ejemplo, el TDAV) en una muestra (por ejemplo, en una muestra biológica tal como suero), que comprende la amplificación a partir de la muestra de un ácido nucleico correspondiente al TDAV; un kit para la detección de un ácido nucleico de un virus en una muestra, comprendiendo el kit un oligonucleótido, oligonucleótidos y/o un par de cebadores para la detección y/o la identificación y/o la cuantificación del TDAV, comprendiendo opcionalmente adicionalmente el kit un soporte sólido y/o uno o más reactivos de amplificación; un procedimiento de producción de una molécula de ácido nucleico, de un péptido y/o de un polipéptido correspondiente al TDAV, comprendiendo el procedimiento la transfección de una célula hospedadora con un vector de expresión que codifica el péptido o el polipéptido, el cultivo de la célula hospedadora de forma que se exprese la molécula del ácido nucleico, el péptido y/o el polipéptido, y el aislamiento del péptido o del polipéptido. Esta divulgación también proporciona otras realizaciones, como reconocería el experto habitual en la materia.

Cualquier indicación de que una característica es opcional pretende proporcionar un apoyo adecuado a las reivindicaciones que incluyen un lenguaje cerrado o exclusivo o negativo con referencia a la característica opcional. El lenguaje exclusivo excluye específicamente la característica indicada en particular para que no incluya ningún asunto en cuestión adicional. Por ejemplo, si se indica que A puede ser el fármaco X, dicho lenguaje pretende proporcionar apoyo para una reivindicación que especifica explícitamente que A consiste únicamente en X, o que A no incluye ningún otro fármaco aparte de X. Un lenguaje "negativo" excluye explícitamente la propia característica opcional del ámbito de las reivindicaciones. Por ejemplo, si se indica que el elemento A puede incluir X, dicho lenguaje pretende proporcionar apoyo a una reivindicación que explícitamente especifica que A no incluye X. Algunos ejemplos no limitantes de términos exclusivos o negativos incluyen "solo", "únicamente", "que consiste en", "que consiste esencialmente en", "solo", "sin", "en ausencia de (por ejemplo, otros elementos del mismo tipo, estructura y/o función)" "excluyendo", "no incluyendo", "no", "no puede", o cualquier combinación y/o variación de dicho lenguaje.

En los siguientes ejemplos se describen adicionalmente algunas realizaciones. Estas realizaciones se proporcionan únicamente como ejemplos y no pretenden limitar el ámbito de las reivindicaciones en modo alguno.

Ejemplos

A continuación se describen los procedimientos utilizados para el aislamiento del genoma de un nuevo virus denominado "virus asociado a la enfermedad de Theiler" (TDAV). El genoma se presenta como la SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos codificante se presenta como la SEQ ID NO.: 2; y la secuencia de aminoácidos se presenta como la SEQ ID NO.: 3.

A. MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

1. Extracción del ARN

Los sueros recogidos de los caballos se almacenaron a -80 °C. El ARN se extrajo a partir de alícuotas de 300 µl de los sueros almacenados usando el reactivo TRIzol LS (Life Technologies) como tal, según el protocolo del fabricante. En resumen, se añadieron 900 µl de TRIzol LS a 300 µl de los sueros; el tubo se agitó a mano; la muestra homogeneizada se incubó durante 5 minutos (min) a la temperatura ambiente; se añadieron 0,24 ml de cloroformo y se agitaron vigorosamente; la muestra se centrifugó a 12.000 x g durante 15 min a 4 °C; se conservó la parte superior de la fase acuosa; se añadieron 15 µg de GlycoBlue (Life Technologies); se añadieron 600 µl de 2-propanol; la muestra se incubó a la temperatura ambiente durante 10 min; la muestra se centrifugó a 12.000 x g durante 10 min a 4 °C; el sobrenadante se desechó; el sedimento de ARN se lavó con etanol al 75 %; el sedimento se secó y el ARN se disolvió en 20 µl de agua. Las muestras de ARN extraídas se sometieron a un tratamiento con Turbo DNA-free (Life Technologies) como tal, según el protocolo del fabricante con una modificación (incluye inhibidor de la RNasa). En resumen, se añadió una mezcla 2,9 µl de tampón Turbo DNase, 5 µl de H₂O y 0,25 µl de inhibidor de la RNasa (Life Technologies) a una muestra de 20 µl de ARN; se añadió 1 µl de Turbo DNase; la muestra se incubó a 37 °C durante 20 min; se añadieron 3 µl de reactivo de inactivación de DNasa; la muestra se incubó a la temperatura ambiente durante 5 min; la muestra se centrifugó a 10.000 x g durante 1,5 min a la temperatura ambiente; se conservaron 21,5 µl del sobrenadante para un análisis adicional.

2. Preparación y secuenciación de la genoteca

En resumen, se usaron 4 µl de ARN tratado con DNasa como molde para la transcripción inversa en las siguientes condiciones: se mezcló cebador 3Sol_N (concentración final, 8 µM) con ARN y se desnaturalizó a 65 °C durante 5 min antes de su incubación en hielo durante 5 min. Se añadieron los reactivos transcriptasa inversa Superscript III (10 U/ul) (Life Technologies), tampón Superscript III (1x), MgCl₂ (5 mM), DTT (10 mM), dNTP (500 µM) y RNaseOUT (0,4 U/ul), y la muestra se incubó a 42 °C durante 60 min seguido de 94 °C durante 4 min. Para la síntesis de la segunda hebra se añadieron 5 µl de una mezcla de tampón Sequenase (0,33x) y Sequenase 2.0 (0,13 U/ul). La temperatura de la reacción se aumentó desde 4 °C hasta 37 °C durante 8 min, después se mantuvo a 37 °C durante 8 min. En una etapa inicial de la PCR, se amplificaron 5 µl de este ADNc con polimerasa de ADN Klentaq LA (0,1 U/ul) (Sigma) en tampón Klentaq (1x), dNTP (200 µM) y cebador 3_Sol (2 mM), y se llevó a cabo la PCR en las siguientes condiciones de ciclación: a 94 °C durante 3 min, 25 ciclos [a 94 °C durante 30 segundos (s), a 40 °C durante 1 min, a 68 °C durante 1 min], a 68 °C durante 7 min. Una PCR final con 4 cebadores usó 10 ng de la reacción inicial de PCR como molde con tampón Klentaq (1x), dNTP (200 µM), cebador SolM1 (10 nM), SolM2_barcode (10 nM), dos oligos elaborados con la modificación CleanAmp Precision™ (TriLink BioTechnologies), 5SolM1_18** (200 nM), 5SolM2_19** (200 nM) y polimerasa de ADN Klentaq LA (0,1 U/ul) y usaron las siguientes condiciones de ciclación para esta etapa de la PCR: a 94 °C durante 1 min, después dos ciclos [a 94 °C durante 30 s, a 40 °C durante 30 s, a 68 °C durante 1 min], a 94 °C durante 10 min, siete ciclos [a 94 °C durante 30 s, a 58 °C durante 30 s, a 68 °C durante 1 min] y a 72 °C durante 5 min. Las genotecas de secuenciación resultantes se purificaron usando DNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research) según el protocolo del fabricante y eluyendo con 20 µl de H₂O. Se seleccionaron por tamaño diez microlitros de las genotecas purificadas (de 423 pb +/- 7 %) usando LabChip XT (kit de ensayo DNA 750, Caliper/Perkin Elmer) y se purificaron adicionalmente mediante una columna Zymo. Las concentraciones individuales de las genotecas se determinaron mediante una qPCR usando una genoteca de control PhiX (Illumina) con los cebadores 1.1 y 2.1 y Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies), según el protocolo del fabricante. Después las genotecas se agruparon en concentraciones equimolares y se volvieron a cuantificar antes de la secuenciación. Se llevó a cabo una secuenciación de extremos apareados (100 ciclos para cada extremo apareado) en el HiSeq2000 (Illumina) con los reactivos de generación agregados v3 y los reactivos SBS, según las instrucciones del fabricante.

3. Secuenciación con Illumina

Se llevó a cabo una secuenciación de extremos apareados (100 ciclos para cada extremo apareado) mediante la generación en primer lugar de agregados en una celda de flujo (FC) del cBot según se describe en la "Guía del usuario del cBot" (Parte #: 15006165 Rev. G, Illumina); la FC agregada se sometió a una secuenciación de extremos apareados en el HiSeq200 según se describe en la "Guía del usuario del HiSeq 2000" (Parte #: 15011190 Rev. K, Illumina).

4. Análisis de la secuenciación

Los datos de la secuencia inicial FASTQ fueron categorizados mediante el índice de secuenciación para cada una de las tres muestras. Se eliminaron los pares de lectura de secuencia para los que una de las lecturas tenía 10 o

más bases no solicitadas (Ns). Las lecturas de baja complejidad se identificaron mediante el análisis del tamaño de la cadena de secuencia Lempel-Ziv-Welch comprimida después de eliminar las Ns de la cadena para evitar aumentos artificiales en la complejidad. Los pares de lectura de secuencia para los que una de las lecturas tenía un tamaño comprimido por debajo de 37 se eliminaron. Las restantes lecturas de secuencia fueron alineadas con el genoma de caballo (EquCab2.0, GCF 000002305.2) (33) mediante un BLAST de nucleótidos (blastn) con el tamaño de palabra y el valor E por defecto (11 y 10, respectivamente). Los pares de lectura de secuencia para los que una de las lecturas tenía al menos 80/100 nucleótidos (80 % de la identidad de lectura total) que se cartografiaban de forma idéntica al genoma del caballo se consideraron derivados del hospedador y se eliminaron del análisis de secuencia abajo. Las lecturas de secuenciación restantes se alinearon mediante blastn como BLAST traducido (blastx) con todos los genomas víricos y secuencias de proteínas de RefSeq (marzo de 2012), respectivamente, con el tamaño de palabra (11 para blastn, 3 para blastx) y el valor E (10 tanto para blastn como para blastx) por defecto. Las secuencias que se emparejaban con la base de datos vírica se aislaron y se consideraron candidatas. Para confirmar el origen vírico en un contexto no sesgado, se alinearon las secuencias víricas candidatas con la base de datos de nucleótidos no redundante (NT; abril de 2012) mediante blastn usando los parámetros por defecto. Las lecturas víricas candidatas que no tenían una alineación con los NT se alinearon con la base de datos de proteínas no redundante (NR; abril de 2012) mediante blastx usando los parámetros por defecto. Las lecturas víricas candidatas cuyas alineaciones de mayor puntuación se cartografiaban únicamente con los genomas víricos se consideraron de origen vírico.

5. Ensamblaje del genoma

Todas las lecturas que se cartografiaban con la familia *Flaviviridae* de cada una de las tres muestras fueron consolidadas en archivos FASTA que representan el punto de partida para los ensamblajes del genoma. Estas lecturas se usaron como siembra para el ensamblaje metatranscriptómico dirigido usando una versión alfa (v0.16.2) del programa informático ensamblador Paired-Read Iterative Contig Extension (PRICE) (<http://derisilab.ucsf.edu/software/price/index.html>). El PRICE usa la información de los extremos apareados para generar ensamblajes locales que extienden los contigios existentes; en este caso, los contigios iniciales eran lecturas con unos emparejamientos de blastx con la familia *Flaviviridae*, y los contigios fueron extendidos repetidamente a lo largo de tantos ciclos como fuera posible. En algunos casos, si se detenía un ensamblaje, los datos de la secuencia no filtrados eran cartografiados con el ensamblaje existente, y las lecturas con un elevado porcentaje de identidad eran desechadas en un esfuerzo por recoger siembras de una calidad más alta para un ensamblaje adicional.

6. Análisis filogenético

Todas las secuencias de poliproteínas de *Flaviviridae* de la RefSeq, además de las secuencias de poliproteínas de los recientemente descubiertos hepacivirus no primates (NPHV) (**Fig. 4 A-N; Tabla 2**), fueron alineadas con la secuencia de poliproteínas del TDAV usando MUSCLE. La alineación de secuencia múltiple fue importada en MEGA5, y se construyó un árbol filogenético de Neighbor-Joining con 100 réplicas de muestreo con reposición y se consideró un árbol de radiación (**Fig. 3**).

Tabla 2. GIs de las secuencias de *Flaviviridae* referenciadas

Nombre del virus	GI	Marcador	Nombre del virus	GI	Marcador
Flavivirus Aedes	254688377	37	Virus Kamiti River	33620714	38
Virus Alkhurma	24432114	30	Virus Karshi	62326810	28
Virus Apoi	20178607	27	Virus Kedougou	226377836	13
Virus Bagaza	226377838	7	Virus Kokobera	126010839	11
Virus de la enfermedad de Border	20198946	41	Virus Langat	20260782	31
Virus de la diarrea vírica bovina 1	9626650	45	Virus Louping ill	9629457	33
Virus de la diarrea vírica bovina 2	9629507	46	Virus Modoc	20177456	26
Virus de la diarrea vírica bovina 3	240114605	44	Virus de la leucoencefalitis de Montana myotis	22550316	24
Virus Bussuquara	126010843	10	Virus de la encefalitis de Murray Valley	9633623	2
Hepacivirus canino	330722930	64	Nphv#1 (afj20709.1)	386686662	60
Agente vírico de fusión celular	9627243	39	Nphv #2 (afj20708.1)	386686660	61
Virus de la fiebre porcina clásica	12657942	42	Nphv #3 (afj20707.1)	386686657	58
Flavivirus Culex	166159178	35	Nphv #4 (afj20706.1)	386686655	62
Virus del Dengue 1	9626686	17	Nphv #5 (afj20705.1)	386686653	63
Virus del Dengue 2	159024209	15	Nphv #6 (afj20704.1)	386686651	59

(continuación)

Nombre del virus	GI	Marcador	Nombre del virus	GI	Marcador
Virus del Dengue 3	163644369	16	Nphv #7 (afj20703.1)	386686649	65
Virus del Dengue 4	12084823	14	Virus de la fiebre hemorrágica Omsk	33589254	32
Virus Donggang	380877199	18	Pestivirus de jirafa 1	20178633	43
Flavivirus Duck TA	379764914	9	Virus Powassan	20260780	29
virus Entebbe bat	119952255	20	Virus Quang Binh	229904920	36
Virus asociado a la enfermedad de Theiler	[TBD]	47	Virus de Rio Bravo	20178609	25
Virus GB A	9629719	49	Virus Sepik	119952253	23
Virus GB B	9628102	51	Virus de la encefalitis de san Luis	123205972	5
Virus GB C	9628706	50	Virus Tamana bat	21397175	40
Virus GB D	300431402	48	Virus Tembusu	340034687	8
Virus de la Hepatitis C gt1	22129793	53	Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas	9628432	34
Virus de la Hepatitis C gt2	157781213	57	Virus Usutu	56692442	1
Virus de la Hepatitis C gt3	157781217	56	Virus Wesselsbron	238801615	22
Virus de la Hepatitis C gt4	157781209	54	Virus del Nilo occidental	158516888	4
Virus de la Hepatitis C gt5	157781211	55	Virus de la fiebre amarilla	9627245	21
Virus de la Hepatitis C gt6	157781215	52	Virus Yokose	33112011	19
Virus Ilheus	126010841	6	Virus Zika	226377834	12
Virus de la encefalitis japonesa	9626461	3			

7. Recuperación física y validación de la secuencia del TDAV

5 El ensamblaje del genoma del TDAV fue validado mediante la recuperación y la secuenciación de diez amplicones solapantes de la RT-PCR que abarcan las posiciones 57-10127 (véase a continuación). La recuperación con éxito de cada amplicón requirió la optimización de las condiciones de la RT y de la PCR. Se usaron dos metodologías de transcripción inversa (RT) diferentes junto con 4 condiciones diferentes de la PCR para recuperar los 10 clones solapantes del TDAV mostrados en la Fig. 2D. Los amplicones para cada par de cebadores se clonaron en el vector TOPO T/A pCR4.0 (Life Technologies) y se secuenciaron las hebras directa e inversa de al menos tres clones independientes (Elim Biopharma). A continuación se describió un resumen de las coordenadas del TDAV para cada uno de los 10 amplicones, sus correspondientes condiciones de transcripción inversa, las condiciones de la PCR y los pares de cebadores de la PCR que produjeron los productos específicos. Para la transcripción inversa se usó el sistema de síntesis SuperScript III First-Stry (Life Technologies) según el protocolo del fabricante para hexámeros aleatorios (condición de la RT 1) o cebadores específicos de gen (condición de la RT 2) con un grupo de los siguientes cebadores: EVT-151, -155, -157, -163, -171, -175, -177, -183, -187 y -189 (Tabla 3). Para las condiciones de las PCR 1-3, se ciclaron una mezcla de reacción de PCR de polimerasa Klentaq LA (molde de ADNc, cebadores de PCR 200 nM, dNTP 200 µM, 0,1 U/µl de polimerasa de ADN Klentaq LA (Sigma-Aldrich) en 1X de tampón Klentaq) en las siguientes 3 condiciones diferentes: (1) a 94 °C durante 60 s, 32 ciclos de 94 °C durante 30 s, a 55 °C durante 30 s, a 68 °C durante 1 min 45 s, seguido de 68 °C durante 7 min; (2) a 94 °C durante 60 s, 32 ciclos de 94 °C durante 30 s, a 59,5 °C durante 30 s, a 68 °C durante 1 min 45 s, seguido de 68 °C durante 7 min; o (3) a 94 °C durante 60 s, después 1 ciclo de 94 °C durante 30 s, a 65 °C durante 30 s, y a 68 °C durante 1 min 45 s, seguido de 9 ciclos adicionales con una disminución de 1 °C en la temperatura de hibridación, después 25 ciclos de 94 °C durante 30 s, a 55 °C durante 30 s, a 68 °C durante 1 min 45 s, después a 68 °C durante 7 min. Para la condición de la PCR 4, se ciclaron una mezcla de reacción de PCR de polimerasa de ADN Phusion (molde de ADNc, cebadores de la PCR 500 nM, dNTP 200 µM y 0,1 U/ul de polimerasa de ADN Phusion (New England Biolabs) en 1X de tampón Phusion HF complementado con DMSO al 3 %) en las siguientes condiciones: a 94 °C durante 60 s, después 1 ciclo de 94 °C durante 30 s, a 65 °C durante 30 s, y a 68 °C durante 1 min 45 s, seguido de 9 ciclos adicionales con una disminución de 1 °C en la temperatura de hibridación, después 25 ciclos de 94 °C durante 30 s, a 55 °C durante 30 s, 68 °C durante 1 min 45 s, seguido de 68 °C durante 7 min (Tabla 4). Finalmente, una de las dos condiciones de RT y una de las cuatro condiciones de PCR produjo un amplicón específico para cada par de cebadores que fue TOPO-clonado según el protocolo del fabricante (Life Technologies, San Diego, CA). Se secuenciaron al menos tres insertos clonados TOPO independientes por parte Elim Biopharma (Hayward, CA).

Tabla 3. Oligonucleótidos usados

Cebador	SEQ ID NO.:	Secuencia (5'-3')	Uso *	Fuente †	Objetivo del cebador	Coordenadas del cebador
EVT-144	36	CGTAAGGGCGCGTAGTGG	1	a	TDAV	57-74
EVT-145	37	CCGAAGCATCAAGGAACC	4	a	TDAV	494-477
EVT-146	4	AGGGTCTTCGGGTAATCC	2, 3	a	TDAV	171-190
EVT-147	5	CCCTCGACTGAATTATAGGC	2, 3, 4	a	TDAV	336-316
EVT-151	38	ACACATTGCAAGGTCTGTCC	1	a	TDAV	1023-1004
EVT-152	39	GGCAGCCTTTAACATCTTCG	1	a	TDAV	1115-1134
EVT-153	40	AACACCCCAATTACAGAGC	1	a	TDAV	1518-1499
EVT-154	6	GCTTCCCTTTGCACTATGG	2	a	TDAV	1674-1693
EVT-155	7	CAAGCCGATGCAACTAAAGC	2	a	TDAV	1829-1810
EVT-157	41	AACCGAGAGTAGCACC AAGC	1	a	TDAV	2917-2898
EVT-158	8	GGCTCTTTGGATTCACTTGC	1,2	a	TDAV	2144-2163
EVT-159	9	CCAGTGACCAGCATAAITCG	1,2	a	TDAV	2309-2290
EVT-160	42	CAAACTCTGATCTGGGAAGG	1	a	TDAV	3100-3119
EVT-161	43	CCCAAGGATAAGGACATTCG	1	a	TDAV	3557-3538
EVT-162	10	ATGCCATGGGTATGTTGACC	2, 3	a	TDAV	3892-3911
EVT-163	11	CTCCTCGTAGTTGCCTTTGC	1, 2, 3	a	TDAV	4046-4027
EVT-164	44	TTTGTGATGAGTGCCACAGC	1	a	TDAV	4324-4343
EVT-165	45	GCGAAGAGAAATGGTGAAGG	1	a	TDAV	4808-4789
EVT-166	46	GTTCTGAACCCGCTCTGTTGC	1	a	TDAV	4128-4147
EVT-167	47	CAGCAACTGCTTATGCTTGG	1	a	TDAV	4304-4285
EVT-169	48	ACCCAAGTTGTTGAGCAAGG	1	a	TDAV	5822-5803
EVT-170	12	TGGGAGTGTCTGGATTATTGC	1, 2	a	TDAV	5607-5627
EVT-171	13	CAAGGTGTCCGAGAGGTAGG	2	a	TDAV	5784-5765
EVT-172	49	TACACTGGACCTTGGGTTGG	1	a	TDAV	6555-6574
EVT-173	50	CACCAGAACCGTAAATCATGG	1	a	TDAV	6966-6946
EVT-174	14	TGGTACTGGTACCCGTCACCTGG	2	a	TDAV	6672-6592
EVT-175	15	GCGAGGACCTGAAGTAGTGC	2	a	TDAV	6734-6715
EVT-177	51	GAGCAGTCAAGTGCACAACC	1	a	TDAV	7881-7862

(continuación)

Cebador	SEQ ID NO.:	Secuencia (5'-3')	Uso *	Fuente †	Objetivo del cebador	Coordenadas del cebador
EVT-178	16	CTCCTGTGCTCCCTGAACC	1,2	a	TDAV	7834-7852
EVT-179	17	AACACCAATTGACCCAGAAGC	1,2	a	TDAV	8000-7981
EVT-180	52	TTGCCATCTTCCAGACTCC	1	a	TDAV	8245-8264
EVT-181	53	ATAAGACCAGCCCGGATACG	1	a	TDAV	8645-8626
EVT-183	54	GTC AACCGTAGCAATGG	1	a	TDAV	9035-9016
EVT-186	18	CTTCTGCCCTACATCCCATCG	2	a	TDAV	9931-9950
EVT-187	19	TGCATACCCTTCGGCTAAGG	2	a	TDAV	10127-10108
EVT-189	55	ACTCCCCCTGTTAACCTTGC	1	a	TDAV	10409-10390
EVT-192	20	ATCGGGGGCGGTTATTCC	2,3	b	ARNr 18S equino (AJ311673)	1079-1096
EVT-193	21	GCTATCAATCTGTCAATCCTGTCC	2,3	b	ARNr 18S equino (AJ311673)	1282-1259
EVT-194	22	CGGGTAAACGGCGGGAGTAAC	2	b	ARNr 28S equino (EU554425)	4-24
EVT-195	23	TAGGTAGGGACAGTGGGAATCTCG	2	b	ARNr 28S equino (EU554425)	112-89
EVT-196	24	CACCACACCTTCTACAAC	2	b	b-actina equina (AFO35774)	259-276
EVT-197	25	ATCTGGGTGATCTTCTCG	2	b	b-actina equina (AFO35774)	365-348
EVT-200	26	GCCATCACCATCTTCCAG	2	b	GAPDH equina (AF157626)	85-103
EVT-201	27	GACTCCACAACATATTCAGC	2	b	GAPDH equina (AF157626)	162-143
3So1 N	56	GCTCTCCGATCTNNNNNN	5	C	Adaptadores de la genoteca Illumina	n.a.
3 Sol	57	GCTCTCCGATCT	5	C	Adaptadores de la genoteca Illumina	n.a.
SolM1	58	AATGATACGGCGACCCGAGATC TACACTCTTTCCTACACGACGCTC TTCCGATCT	5	C	Adaptadores de la genoteca Illumina	n.a.
SolM2	59	CAAGCAGAAAGCGGCATACGAGAT NNNNNNNGTACTGGAGTTCAGAC GTGTGCTCTCCGATCT	5	C	Adaptadores de la genoteca Illumina	n.a.

(continuación)

Cebador	SEQ ID NO.:	Secuencia (5'-3')	Uso *	Fuente †	Objetivo del cebador	Coordenadas del cebador
5SolMI 18 **	60	AATGATACGGCGACCACC	5	C	Adaptadores de la genoteca Illumina	n.a.
5SolM2 19 **	61	CAAGCAGAAGACGGCATAC	5	C	Adaptadores de la genoteca Illumina	n.a.
1.1	62	AATGATACGGCGACCACCGAGAT	6	a	Adaptadores de la genoteca Illumina	n.a.
2.1	63	CAAGCAGAAGACGGCATACGA	6	a	Adaptadores de la genoteca Illumina	n.a.

* Uso 1 = recuperación física de los amplicones del TDAV para la validación de la secuenciación del genoma, Uso 2 = desarrollo del ensayo de qRT-PCR del TDAV, Uso 3 = ensayo de qRT-PCR usado en este estudio, Uso 4 = RACE en 5' del TDAV, Uso 5 = preparación de la genoteca de secuenciación Illumina, Uso 6 = ensayo de PCR cuantitativa para las preparaciones de la genoteca de secuenciación Illumina.

† fuente a = este estudio, fuente b = Zhang YW, Davis EG y Bai J, 2009. Determination of internal control for gene expression studies in equine tissue and cell culture using quantitative RT-PCR. Veterinary Immunology and Immunopathology 130, 114-119; fuente c = Runckel C, Flenniken, ML, Engel JC, Ruby JG, Ganem D, Andino R, y DeRisi JL, 2011. Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, Nosema and Crithidia. PLoS One. 6 (6): e20656. Publicación electrónica del 7 de junio de 2011.

÷ La X en la secuencia implica las posiciones de base de las secuencias de código de barras en los adaptadores de la genoteca Illumina usados en este estudio.

** oligo ADN creado con la modificación CleanAmp Precision™ (TruLink BioTechnologies, San Diego, CA).

Tabla 4. Condiciones de la RT-PCR para la recuperación física de la secuencia del TDAV

Coordenadas del amplicón del TDAV	Condición de la RT *	Condición de la PCR *	Cebadores de la PCR †
1-336	RACE en 5' (véase a continuación)	RACE en 5' (véase a continuación)	Adaptador de la RACE en 5', EVT147
57-1518	2	1	EVT-144, -153
1115-2309	1	1	EVT-152, -159
2144-3557	2	1	EVT-158, -161
3100-4304	1	1	EVT-160, -167
4128-4808	2	4	EVT-166, -165
4324-5822	2	3	EVT-164, -169
5607-6966	1	2	EVT-170, -173
6555-8000	1	2	EVT-172, -179
7834-8645	2	2	EVT-178, -181
8245-10127	1	2	EVT-180, -187

* Véase Materiales y procedimientos para la descripción detallada de las condiciones recogidas.
† Véase la Tabla 3 para las secuencias de los cebadores de la PCR.

Se recuperó la secuencia más 5' del TDAV mediante la realización de una amplificación rápida de los extremos del ADNc en 5' (5'-RACE) según el protocolo del fabricante (Life Technologies). En resumen, se usaron 2 µl del ARN de dos sujetos (el Caballo A1 y el Caballo A2) y la antitoxina 2 como aporte en la etapa inicial de la RT. La transcripción inversa se cebó con EVT-145 (Tabla 3). Los ADNc purificados se sometieron a una reacción de prolongación con dCTP. El ADNc con la prolongación de dCTP se usó como molde para la PCR con EVT-147 (Tabla 3) y el cebador proporcionado por el fabricante Abridged Anchor. La PCR se llevó a cabo según el protocolo del fabricante para la polimerasa Taq (New England BioLabs) con las siguientes condiciones de ciclado: a 94 °C durante 2 min, después 32 ciclos de 94 °C durante 30 s, a 55 °C durante 30 s, a 72 °C durante 1 min, seguido de 72 °C durante 7 min. Los productos de la PCR se purificaron y se concentraron mediante una purificación en columna (DNA Clean & Concentrator™-5, Zymo Research) según el protocolo del fabricante. Los productos purificados de la RACE en 5' se seleccionaron por tamaños (292-438 pb) usando el LabChip XT (kit de ensayo DNA 750, Caliper/Perkin Elmer).

8. Ensayo diagnóstico del TDAV basado en una PCR

El ensayo diagnóstico de qRT-PCR del TDAV usó un ARN aislado a partir de 300 µl de suero o de plasma equino, como se ha descrito anteriormente. Se usaron dos microlitros de ARN para llevar a cabo la transcripción inversa con un cebado aleatorio según el protocolo del fabricante (Superscript III First-Stry Synthesis System, Life Technologies). Se añadió ADNc diluido (1:10) a las reacciones de qPCR con Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies) y uno de los siguientes pares de cebadores: EVT-162/-163 (TDAV), EVT-146/147 (TDAV) y EVT-192/-193 (ARNr 18S equino). Todas las muestras estaban enmascaradas y las reacciones se llevaron a cabo al menos por triplicado. El ensayo de qRT-PCR del TDAV estaba diseñado para separar las muestras positivas conocidas y negativas conocidas mediante al menos 9 C_t en los experimentos piloto iniciales. No pudieron establecerse unos valores umbral predefinidos de C_t para la positividad del TDAV debido a la pequeña variabilidad de un día a otro en el ensayo; por lo tanto, la positividad se definió como i) la detección de ARNr 18S equino con unos C_t sustancialmente menores a los de las muestras enmascaradas predichas como H₂O y ii) la detección del ARN vírico con ambos conjuntos de cebadores del TDAV con unos C_t sustancialmente menores que en las muestras enmascaradas predichas como controles negativos.

B. RESULTADOS

1. Resumen del brote epidémico

Se investigó un brote epidémico de la enfermedad de Theiler que se produjo en una granja de caballos en el oeste de los Estados Unidos después de un tratamiento profiláctico de los animales para un envenenamiento por toxina botulínica. La granja (Granja A) alojaba una población de 75 caballos, de los que a cuatro se les diagnosticaron signos de envenenamiento por botulismo después del consumo de alimentos contaminados. Dos de los caballos presentaron una rápida aparición de parálisis y fueron sacrificados. Los otros dos caballos mostraron unos síntomas más leves, se trataron con plasma antitoxina botulínica equina, y se recuperaron por completo. Como medida profiláctica se administró después un tratamiento antitoxina botulínica a los otros 21 caballos con sospecha de haber estado expuestos al alimento contaminado. Debido a que las cantidades del lote de antitoxina inicial estaban limitadas, a los primeros cuatro caballos se les proporcionó la misma antitoxina usada para el tratamiento de los dos caballos asintomáticos ('Antitoxina 1') y a 17 caballos se les administró una antitoxina botulínica de una fuente independiente ('Antitoxina 2'). Los restantes caballos de la granja se dejaron sin tratar. Uno de los caballos que se

trató con la Antitoxina 1 tras presentar unos síntomas leves de botulismo fue retirado de la granja y no estuvo disponible para una monitorización adicional, dejando un total de 22 caballos que se trataron con la Antitoxina 1 (N = 5) o la Antitoxina 2 (N = 17) para una observación y un ensayo continuado. A las ocho semanas, dos de los caballos tratados con la Antitoxina 2 (el Caballo A1 y el Caballo A2) mostraron signos de la enfermedad de Theiler, incluyendo letargia, disminución en el apetito, fotodermatitis e ictericia. Los niveles séricos de las enzimas hepáticas también estaban notablemente elevados en ambos caballos. Todos los caballos que recibieron el tratamiento con antitoxina fueron posteriormente monitorizados para evaluar síntomas manifiestos de hepatitis, y se ensayaron semanalmente muestras séricas para evaluar signos de daños hepáticos (niveles elevados de la transaminasa de aspartato (AST), de la transferasa de gamma glutamilo (GGT), de la deshidrogenasa de sorbitol (SDH), de la deshidrogenasa de glutamato (GLDH o GD) y de bilirrubina). En total, ocho de los 22 caballos que recibieron el tratamiento con la antitoxina desarrollaron una hepatitis a lo largo de las siguientes varias semanas (Fig. 1). Los ocho casos se produjeron en caballos que habían sido tratados con la Antitoxina 2, lo que hizo aparecer la posibilidad de que esta preparación pudiera portar un agente causal químico o infeccioso. Para abordar esta última posibilidad, extrajimos el ARN y preparamos genotecas de secuenciación a partir de muestras de suero de los dos casos iniciales (el Caballo A1 y el Caballo A2), así como partir de la propia Antitoxina 2.

2. La detección de la secuencia vírica da lugar al ensamblaje de un nuevo genoma de *Flaviviridae*

Una secuenciación paralela masiva de las genotecas del Caballo A1, el Caballo A2 y la Antitoxina 2 dieron como resultado una media de 22 millones de lecturas de secuencias de 100 nucleótidos (nt) para cada muestra. Para las dos muestras de suero, la filtración por complejidad y hospedador de los datos de la secuencia en bruto eliminó aproximadamente un 95 % de las lecturas de los análisis secuencia abajo. Para la muestra de la Antitoxina 2, la filtración por complejidad y hospedador eliminó aproximadamente un 50 % de las lecturas. Las lecturas restantes fueron cartografiadas a todas las secuencias proteicas víricas de la RefSeq. Para los Caballos A1 y A2 aproximadamente un 0,01 % de las lecturas de secuencia (2954 y 3522 lecturas, respectivamente) se cartografiaron con miembros de *Flaviviridae*; un 0,06 % (9116) de las lecturas de la Antitoxina 2 se cartografiaron con la misma familia de virus. Además de la abundancia de lecturas de *Flaviviridae* en cada muestra, el Caballo A1 tenía un único cartografiado de par de lectura de *Baculoviridae*, una familia de virus de insecto, y otro par de lectura derivado de *Adenoviridae*, cartografiado con la región encontrada en los vectores de recombinación de laboratorio; el Caballo A2 contenía 80 pares de lectura que derivaban de una región continua de 298 nt del virus del moteado suave del pimiento, un virus vegetal de la familia *Virgaviridae*. Estas lecturas probablemente representan una contaminación por artefactos introducida durante la recolección de muestras y la preparación de la genoteca. El Caballo A2 contenía adicionalmente cuatro pares de lectura derivados del herpesvirus equino 2, un virus común asociado a la enfermedad respiratoria leve en caballos. No se detectaron lecturas víricas adicionales en la muestra de la Antitoxina 2. Las lecturas de secuencia que se cartografiaron con miembros de *Flaviviridae* se usaron como el punto de partida para los ensamblajes del genoma *de novo* usando el algoritmo de ensamblaje PRICE. Se ensambló un cóntigo de 10,5 kilobases (kb) correspondiente a un genoma previamente desconocido y divergente de la familia *Flaviviridae* a partir de las secuencias del Caballo A1, y se ensamblaron largos cóntigos de un genoma esencialmente idéntico (> 99 % de identidad en la secuencia de nucleótidos) a partir de las muestras del Caballo A2 y la Antitoxina 2 (Fig. 2A). El cartografiado de las lecturas de cada muestra de nuevo con respecto al genoma ensamblado reveló que la verdadera cobertura de la secuencia vírica era dos órdenes de magnitud mayor que la inicialmente percibida: un 0,8 % de las lecturas del Caballo A1, un 1,4 % de las lecturas del Caballo A2 y un 2,4 % de las lecturas de la Antitoxina 2 se cartografiaron con un genoma recuperado (Fig. 2B). Este nuevo genoma (*el virus asociado a la enfermedad de Theiler* (TDAV)) se proporciona en la SEQ ID NO.: 1, la secuencia de aminoácidos codificante de la SEQ ID NO.: 1 se presenta como la SEQ ID NO.: 2, y la secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO.: 1 y la SEQ ID NO.: 2 se presenta como la SEQ ID NO.: 3.

3. Características del genoma del virus asociado a la enfermedad de Theiler (TDAV)

Con objeto de validar el ensamblaje del genoma generado por ordenador, se investigó en primer lugar la presencia de reordenaciones estructurales artificiales. En un ensamblaje exento de artefactos, los tamaños del amplicón informatizado a lo largo del genoma deberían coincidir con el tamaño del amplicón seleccionado durante la preparación de la genoteca. Esto fue evaluado mediante el cálculo de la distancia entre los pares de lectura que se cartografiaban de nuevo con el genoma del TDAV, y mediante la representación gráfica del valor mediano de todos los tamaños de amplicón calculados en cada posición. Los tamaños de amplicón calculados basados en los datos del Caballo A1 coincidían estrechamente con el tamaño del inserto generado experimentalmente de 300 ± 30 nucleótidos (nt) (Fig. 2C). Para obtener apoyo empírico para la presencia de la secuencia predicha del TDAV en muestras clínicas, se llevó a cabo una RT-PCR. Se amplificó el ARN preparado a partir del suero del Caballo A1 con pares de cebadores predichos para producir diez amplicones solapantes que engloban prácticamente el ensamblaje del genoma completo del TDAV (Fig. 2D). Los diez amplicones fueron recuperados con éxito. La clonación y la secuenciación Sanger de tres clones independientes de cada amplicón revelaron una identidad de nucleótidos de > 99 % con el ensamblaje del TDAV generado en sílice. Los extremos 5' y 3' del ensamblaje del genoma del TDAV estaban subrepresentados en la genoteca inicial (Fig. 2B). Se investigó el extremo 5' mediante una RACE en 5' (amplificación rápida de los extremos del ADNc) usando muestras de ARN del Caballo A1, el Caballo A2 y la Antitoxina 2. Este procedimiento extendió el ensamblaje de la secuencia inicial en 24 nucleótidos. El nucleótido terminal notificado en 5' ('T') fue encontrado en 21 de los 35 clones, mientras que nueve clones contenían un nucleótido terminal diferente en esa posición, y cinco clones contenían un único nucleótido adicional secuencia

arriba ('T') (Fig. 8). La secuencia del extremo 3' no se extendió más allá del ensamblaje de la lectura de secuenciación.

El ensamblaje del genoma del TDAV tiene aproximadamente 10.479 nt de longitud, englobando la región no traducida en 5' (UTR), un único marco abierto de lectura (ORF) que se inicia en un AUG en la posición 618 y que codifica una poliproteína supuesta de 3189 restos de aminoácidos (aa) de longitud, y 292 nt de la UTR en 3'. Mediante una comparación con la relacionada *Flaviviridae*, el genoma del TDAV codifica tres supuestas proteínas estructurales (núcleo, E1, E2) y siete no estructurales (un producto génico de longitud variable que se cartografía entre E2 y NS2, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) (Figs. 2 y 9).

Aunque parece que el TDAV está más estrechamente relacionado con los virus GB y los hepacivirus en la filogenia *Flaviviridae* (Figs. 3 y 4 A-N), es muy divergente de ambos grupos. El TDAV comparte únicamente una identidad del 35,3 % en la secuencia de aminoácidos a lo largo de la longitud de la totalidad de la poliproteína con su pariente más cercano, el virus GB D (GBV-D), una identidad del 20,5 % con el virus de la hepatitis C (genotipo 1; HCV-gt1) y una identidad del 20,4 % con el miembro más estrechamente relacionado de los *Flaviviridae* recientemente identificado en caballos, el hepacivirus no primate (NPHV). La identidad en la secuencia por parejas entre el TDAV y estas especies varía drásticamente (Fig. 2E, Fig. 4 A-N). La supuesta proteasa de serina, la NS3, y la polimerasa de ARN dependiente de ARN, la NS5B, son las regiones más conservadas de la poliproteína, excediendo algunas regiones una identidad del 75 % en los aminoácidos con el GBV-D (Fig. 2E). En el nt 617 y el nt 292, la UTR en 5' del TDAV (posiblemente parcial) y las UTR en 3' son más largas que las que se encuentran en los hepacivirus (de aproximadamente 340 nt y 200-235 nt, respectivamente). Aunque parecía haber un significativo potencial para la estructura secundaria predicha en cada UTR, el IRES canónico u otros motivos estructurales del ARN típicos de otros *Flaviviridae* no son fácilmente evidentes (Fig. 9). La proteína del núcleo, que sirve como la nucleocápside en el HCV, esta truncada o ausente en el GBV-A, el GBV-C y el GBV-D (15). En el TDAV, su tamaño predicho también es pequeño (26 aa), con un supuesto sitio de escisión de la peptidasa de señalización entre los aminoácidos 15 y 16. Asimismo, las cuatro proteínas predichas del TDAV, que yacen entre la E2 y la NS2, parecen ser más similares al virus GB que a los hepacivirus. En el HCV, esta región codifica la p7, una proteína de 7 kDa (63 aa) que es importante para el ensamblaje y la liberación del virus. En los virus GB, la proteína varía desde 6 kDa (en el GBV-C) hasta 21 kDa (en el GBV-A), y su papel en el ciclo de vida del virus no está claro. La correspondiente proteína del TDAV tiene un peso molecular predicho de aproximadamente 10,8 kDa. Finalmente, al contrario que los GB y los hepacivirus, la proteína NS5A del TDAV contiene tres supuestas inserciones que abarcan aproximadamente 160 aa que no se encuentran en ningún miembro relacionado de los *Flaviviridae*, incluyendo una gran inserción de prácticamente 100 aa en el dominio 1b de la NS5A, y dos inserciones más cortas en el dominio 2 (Fig. 4 A-N). El papel funcional de estas inserciones es desconocido.

4. Ensayo diagnóstico basado en una PCR

Tras la validación de la secuencia del genoma del TDAV, se desarrolló un ensayo diagnóstico basado en una PCR para cribar la presencia del TDAV en muestras clínicas (por ejemplo, en suero). Se diseñaron ocho pares de cebadores candidatos dirigidos a productos de 130-200 nt de todo el genoma del TDAV (Tablas 3, 5). Estos cebadores de la qRT-PCR, y los cuatro descritos previamente para los genes constitutivos equinos, se ensayaron para evaluar su comportamiento en un ensayo de qPCR basado en una SYBR green con muestras recogidas a partir del brote epidémico. Se usó el ARN preparado a partir de las siguientes fuentes para probar estos 12 pares de cebadores: tres muestras en las que se identificó el TDAV mediante una secuenciación Illumina (las primeras muestras recogidas de los caballos A1 y A2, y la Antitoxina 2; estas sirvieron como positivos confirmados para los ensayos del TDAV y como positivos sospechosos para los ensayos del gen constitutivo equino), tres muestras de agua (estas servían como controles negativos para ambos ensayos del TDAV y del gen constitutivo equino), ocho muestras de los caballos tratados con la Antitoxina 1 (dos muestras disponibles recogidas de los caballos A19, A20, A21 y A22; estas servían como sospechosos negativos para los ensayos del TDAV, y positivos esperados para los ensayos del gen constitutivo equino), y dos muestras procedentes de los caballos tratados con la Antitoxina 2 (dos muestras disponibles recogidas a partir del caballo A18; estas servían como sospechosos positivos para los ensayos del TDAV y como positivos esperados para los objetivos constitutivos equinos). Se extrajo el ARN total a partir de 300 µl de una muestra de suero proporcionada para el estudio según se describe en la sección de Materiales y procedimientos del manuscrito. Se transfirió una alícuota de cada muestra a tubos nuevos y se proporcionó a un segundo investigador para que la procesara de forma enmascarada como sigue: se usaron 2 µl de muestra como molde en una reacción de 20 µl de cebado aleatorio con hexámero con el Superscript III First Stry Synthesis System para el kit de RT-PCR (Life Technologies), según el protocolo del fabricante. Los ADNc resultantes se diluyeron a 1:3 con H₂O exenta de nucleasa, y se usaron 2 µl como molde introducido para los ensayos de qPCR con SYBR green, conteniendo cada uno de los 12 pares de cebadores de la mezcla de reacción 7,8 µl de H₂O, 0,2 µl de una mezcla 10 µM del par de cebadores de la qPCR y 10 µl de la mezcla FAST SYBR Green Master (Life Technologies). La qPCR se llevó a cabo con un instrumento ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System según los parámetros de ciclado recomendados por el fabricante (a 95 °C, 20 s de etapa de desnaturalización, 40 ciclos de 95 °C, 1 s, a 60 °C, 20 s), seguido de un análisis de disociación. Se usaron los siguientes criterios para identificar los pares de cebadores para las solicitudes de la presencia o ausencia del ARN vírico y del ARN del hospedador equino antes de desenmascarar los identificadores de la muestra: un único pico en el análisis de la curva de disociación posterior a la qPCR y un único producto del tamaño esperado en los análisis de confirmación de la electroforesis en gel de agarosa; valores de C_t para las señales sospechosas positivas < 30; valores de C_t para las señales sospechosas

5 negativas > 35; valores de C_t para las muestras sospechosas de H_2O > 39; una diferencia mínima de 9 C_t entre el menor valor de C_t para las solicitudes negativas y el mayor valor de C_t para las solicitudes positivas. En la Tabla 6A se proporciona un resumen de los resultados. Los pares de cebadores del TDAV EVT146/147, EVT154/155, EVT162/163 y los cebadores constitutivos equinos EVT192/193 cumplen los criterios anteriores. El uso de cualquiera de estos cebadores del TDAV junto con el par de cebadores constitutivo EVT192/193 produjo una precisión del 100 % en la identificación de los diferentes tipos de muestra (TDAV⁺, TDAV⁻ o H_2O) probados en este ensayo.

Tabla 5. Pares de cebadores utilizados en el desarrollo del ensayo diagnóstico de la qRT-PCR del TDAV

Objetivo del par de cebadores (identificador del GenBank)	Cebador directo (coordenadas objetivo)	Secuencia del cebador (5'- 3')	Cebador inverso (coordenadas objetivo)	Secuencia del cebador (5'-3')	Coordenadas del amplicón	Longitud del amplicón (pb)
TDAV	EVT-146 (171-190)	AGGGTTCTTCGGGTAAA TCC (SEQ ID NO.: 4)	EVT-147 (336-316)	CCCTCGGACTGAATTATA GGC (SEQ ID NO.: 5)	171-336 (SEQ ID NO.: 28)	166
TDAV	EVT-154 (1674-1693)	GCTTTCCTTTCGCACTAT GG (SEQ ID NO.: 6)	EVT-155 (1829-1810)	CAAGCCGATGCAACTAA AGC (SEQ ID NO.: 7)	1674-1829 (SEQ ID NO.: 29)	156
TDAV	EVT-158 (2144-2163)	GGCTCTTTGGATTCACTT GC (SEQ ID NO.: 8)	EVT-159 (2309-2290)	CCAGTGACCAGCATAAT TCG (SEQ ID NO.: 9)	2144-2309 (SEQ ID NO.: 30)	166
TDAV	EVT-162 (3892-3911)	ATGCCATGGGTATGTTG ACC (SEQ ID NO.: 10)	EVT-163 (4046-4027)	CTCCTCGTAGTTGCCTTT GC (SEQ ID NO.: 11)	3892-4046 (SEQ ID NO.: 31)	155
TDAV	EVT-170 (5607-5627)	TGGGAGTGTCTGGATTA TTGC (SEQ ID NO.: 12)	EVT-171 (5784-5765)	CAAGGTGTCCGAGAGGT AGG (SEQ ID NO.: 13)	5607-5784 (SEQ ID NO.: 32)	178
TDAV	EVT-174 (6572-6592)	TGGTACTGGTACCGTCA CTGG (SEQ ID NO.: 14)	EVT-175 (6734-6715)	GCGAGGACCTGAAGTAG TGC (SEQ ID NO.: 15)	6572-6734 (SEQ ID NO.: 33)	163
TDAV	EVT-178 (7834-7852)	CTCCTGTGCTCCCTGAAC C (SEQ ID NO.: 16)	EVT-179 (8000-7981)	AACACCATTGACCCAGA AGC (SEQ ID NO.: 17)	7834-8000 (SEQ ID NO.: 34)	167
TDAV	EVT-186 (9931-9950)	CTTCTGCCTACATCCCAT CG (SEQ ID NO.: 18)	EVT-187 (10127-10108)	TGCATACCTTTCGGCTAA GG (SEQ ID NO.: 19)	9931-10127 (SEQ ID NO.: 35)	197
ARNr 18S equino (AJ311673)	EVT-192 (1079-1096)*	ATGGGGGGCGGTTATTC C (SEQ ID NO.: 20)	EVT-193 (1282-1259)*	GCTATCAATCTGTCAATC CTGTCC (SEQ ID NO.: 21)	1079-1282	204

(continuación)

Objetivo del par de cebadores (identificador del GenBank)	Cebador directo (coordenadas objetivo)	Secuencia del cebador (5'-3')	Cebador inverso (coordenadas objetivo)	Secuencia del cebador (5'-3')	Coordenadas del amplión	Longitud del amplión (pb)
TDAV	EVT-146 (171-190)	AGGGTTCTTCGGGTA TCC (SEQ ID NO.: 4)	EVT-147 (336- 316)	CCCTCGGACTGAATTATA GGC (SEQ ID NO.: 5)	171-336 (SEQ ID NO.: 28)	166
TDAV	EVT-154 (1674-1693)	GCTTTCCTTGGCACTAT GG (SEQ ID NO.: 6)	EVT-155 (1829-1810)	CAAGCCGATGCAACTAA AGC (SEQ ID NO.: 7)	1674-1829 (SEQ ID NO.: 29)	156
TDAV	EVT-158 (2144-2163)	GGCTCTTGGATTCACCTT GC (SEQ ID NO.: 8)	EVT-159 (2309-2290)	CCAGTGACCAGCATAAT TCG (SEQ ID NO.: 9)	2144-2309 (SEQ ID NO.: 30)	166
TDAV	EVT-162 (3892-3911)	ATGCCATGGGTAIGTTG ACC (SEQ ID NO.: 10)	EVT-163 (4046-4027)	CTCCTCGTAGTTGCCCTTT GC (SEQ ID NO.: 11)	3892-4046 (SEQ ID NO.: 31)	155
TDAV	EVT-170 (5607-5627)	TGGGAGTGCTGGATTA TTGC (SEQ ID NO.: 12)	EVT-171 (5784-5765)	CAAGGTGTCCGAGAGGT AGG (SEQ ID NO.: 13)	5607-5784 (SEQ ID NO.: 32)	178
TDAV	EVT-174 (6572-6592)	TGGTACTGGTACCCTCA CTGG (SEQ ID NO.: 14)	EVT-175 (6734-6715)	GCGAGGACCTGAAGTAG TGC (SEQ ID NO.: 15)	6572-6734 (SEQ ID NO.: 33)	163
TDAV	EVT-178 (7834-7852)	CTCCTGTGCTCCCTGAAC C (SEQ ID NO.: 16)	EVT-179 (8000-7981)	AACACCATTGACCCAGA AGC (SEQ ID NO.: 17)	7834-8000 (SEQ ID NO.: 34)	167
TDAV	EVT-186 (9931-9950)	CTTCTGCCCTACATCCCAT CG (SEQ ID NO.: 18)	EVT-187 (10127-10108)	TGCATACCTTTCGGCTAA GG (SEQ ID NO.: 19)	9931-10127 (SEQ ID NO.: 35)	197

(continuación)

Objetivo del par de cebadores (identificador del GenBank)	Cebador directo (coordenadas objetivo)	Secuencia del cebador (5'-3')	Cebador inverso (coordenadas objetivo)	Secuencia del cebador (5'-3')	Coordenadas del amplicón	Longitud del amplicón (pb)
ARNr 18S equino (AJ311673)	EVT-192 (1079-1096) *	ATGCGGGCGGTTATTC C (SEQ ID NO.: 20)	EVT-193 (1282-1259) *	GCTATCAAATCTGTCAATC CTGTCC (SEQ ID NO.: 21)	1079-1282	204
ARNr 28S equino (EU554425)	EVT-194 (424) *	CGGGTAAACGGCGGGAG TAAC (SEQ ID NO.: 22)	EVT-195 (11289) *	TAGGTAGGGACAGTGGG AATCTCG (SEQ ID NO.: 23)	4-112	109
b-actina equina (AFO35774)	EVT-196 (259-276) *	CACCACACCTTCTACAA C (SEQ ID NO.: 24)	EVT-197 (365-348) *	ATCTGGGTCATCTTCTCG (SEQ ID NO.: 25)	259-365	107
GAPDH equina (AF157626)	EVT-200 (86-103) *	GCCATCACCACTTCCA G (SEQ ID NO.: 26)	EVT-201 (162-143) *	GACTCCACAACATATTCA GC (SEQ ID NO.: 27)	86-162	77

* Zhang, et al. Determination of internal control for gene expression studies in equine tissue and cell culture using quantitative RT-PCR. Veterinary Immunology and Immunopathology 130, 114-119 (2009)

Tabla 6. Resumen del comportamiento de los pares de cebadores del TDAV en los experimentos de desarrollo del ensayo diagnóstico de la qRT-PCR

Par de cebadores	EVT146/147	EVT154/155	EVT158/159	EVT162/163	EVT170/171	EVT174/175	EVT178/179	EVT186/187
Tamaño esperado del producto	166	156	166	155	178	163	167	197
¿Pico único en la curva de disociación?	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
¿Banda única mediante una electroforesis en gel de agarosa?	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Ct positivo promedio	23,998272	22,816635	24,073905	23,3769656	24,445335	22,9622892	24,0450046	25,262662
Ct positivo DT	1,952790687	1,845523611	2,071521833	1,949123321	1,882648998	1,772919767	1,97674361	1,803558843
% de DT	8,136686448	8,08850039	8,604843432	8,337794368	7,701465323	7,721006175	8,221015729	7,139227225
Ct positivo c	22,629717	21,35401	22,62725	21,807777	22,744625	21,629707	22,624638	23,30096
Ct positivo máx	27,373388	25,947899	27,68374	26,708012	27,652481	26,053658	27,513517	27,984766
Ct negativo promedio	40	39,55607	32,94639491	40	37,97325245	36,52777509	38,88814582	39,49451136
Ct negativo DT	0	1,472349243	0,63249358	0	2,635299417	2,884971089	3,687603143	1,676516143
% de DT	0	3,722182823	1,919765673	0	6,93988333	7,898020293	9,48258927	4,24493451
Ct negativo min	40	35,11677	32,020447	40	33,91935	33,245102	27,769604	34,439625
Ct negativo máx	40	40	33,749054	40	40	40	40	40
Ct pos promedio - Ct neg promedio	16,0001728	16,739435	8,872489909	16,6230344	13,52791745	13,56548589	14,84314122	14,23184936
Ct pos máx - Ct neg máx	12,626612	9,168871	4,336707	13,291988	6,266869	7,191444	0,256087	6,454859

5. Estudio epidemiológico para evaluar la presencia del TDAV

Se llevó a cabo un estudio epidemiológico para comprender la prevalencia del TDAV en caballos, para investigar la correlación entre los síntomas clínicos y la viremia, y para determinar si existe una transmisión natural de animal a animal. Se desarrolló un ensayo del TDAV basado en una qRT-PCR (véase más arriba) y se empleó para cribar suero o plasma de 60 caballos de tres instalaciones geográficamente distantes. La Granja A, en la que tuvo lugar el brote epidémico de la enfermedad de Theiler, proporcionó muestras de 37 caballos. Algunos pastaban en los campos habituales o estaban alojados en establos comunes. Los caballos de la Granja A se dividieron en tres subgrupos: 15 caballos no habían sido tratados con la antitoxina botulínica, 17 caballos (incluyendo el Caballo A1 y el Caballo A2) habían recibido la Antitoxina contaminada 2, y 5 caballos habían recibido la Antitoxina 1 no contaminada. La Granja B estaba ubicada en un estado diferente al de la Granja A y se analizó el suero de 20 caballos de la Granja B sin antecedentes de exposición a la antitoxina de ninguna fuente. La Granja D (donante) era la instalación en la que se había preparado la Antitoxina botulínica 2 mediante la agrupación del plasma de tres caballos inmunizados con la toxina botulínica; se proporcionaron muestras de los tres caballos donantes.

Los resultados del ensayo de detección del TDAV mediante una qRT-PCR se muestran como los valores de C_t representados gráficamente en un eje y invertido (Fig. 5A). De los 17 caballos expuestos a la Antitoxina 2 de la Granja A, 15 mostraron unos bajos valores de C_t , lo que indica positividad para el TDAV. Los dos caballos tratados con la Antitoxina 2 (A7 y A11) que aparentemente eran negativos mediante el ensayo de la qRT-PCR usando los cebadores EVT-146/-147, mostraron una señal positiva en algunos de los replicados de la qPCR en un análisis paralelo de estas muestras con el conjunto de cebadores EVT-162/-163; esto sugiere que estos animales pueden haber desarrollado una infección con unos títulos de TDAV rondando el límite de detección del ensayo. Ninguno de los replicados de la qPCR de ningún animal que no estuviera expuesto a la Antitoxina 2 mostró una señal positiva en ningún ensayo diagnóstico del TDAV. Todos los caballos (40/40) no tratados o tratados con la Antitoxina 1 de las Granjas A y B eran negativos para el TDAV. De los tres caballos donantes de la Granja D, dos animales eran negativos para el TDAV, mientras que uno era positivo; este animal es posiblemente la fuente de la contaminación de la Antitoxina 2. Estos resultados establecen una fuerte asociación de la infección por el TDAV con la exposición a la Antitoxina 2, y adicionalmente sugieren que el virus no es muy prevalente en los caballos sin tratar. Adicionalmente, el hecho de que el TDAV no se detectara en los caballos de la Granja A que no recibieron la Antitoxina 2, a pesar del contacto con los caballos infectados por el TDAV durante 1 año, sugiere que el TDAV no se diseminaba fácilmente entre los caballos.

Durante el brote epidémico de la enfermedad de Theiler en la Granja A, los animales se clasificaron ampliamente como los que tienen hepatitis y los que no tienen hepatitis. Los caballos con hepatitis fueron clasificados adicionalmente en caballos que eran "clínicos" y subclínicos". Los casos clínicos mostraban una elevación significativa de las enzimas hepáticas en el suero, junto con los signos clínicos habituales de la enfermedad tales como ictericia, letargia, bajo apetito y fotodermatitis. Los casos subclínicos mostraban unos grados variables de elevación de las enzimas hepáticas en el suero, pero sin unas manifestaciones clínicas evidentes de enfermedad hepática. Para investigar la correlación entre la carga vírica y el cuadro clínico, los datos del ensayo de la qRT-PCR de los animales expuestos a la Antitoxina 2 fueron clasificados según el estado de hepatitis y el nivel de síntomas (Fig. 5B). Dado que el intervalo de los valores de C_t (que representan una carga vírica de 10^6 - 10^8 genomas/ml; SI Materiales y procedimientos) era similar tanto para los caballos positivos para hepatitis como negativos para hepatitis, no era evidente una correlación entre el estado de hepatitis o los síntomas clínicos y la carga vírica. Además, en cada grupo (positivo para hepatitis y negativo para hepatitis) se observó un único caballo (A7 y A11, respectivamente) con una carga vírica que estaba por debajo de este intervalo, que apoyaba adicionalmente la conclusión de que la carga vírica no es predictiva de la magnitud de los daños hepáticos.

6. Estudio de inoculación experimental

Para comprender mejor la dinámica de la infección por el TDAV y el papel del virus en la progresión de la enfermedad, se llevó a cabo un pequeño estudio de inoculación experimental. A cuatro caballos que estaban sanos y exentos de signos clínicos o bioquímicos de enfermedad hepática, según las evaluaciones iniciales, se les administraron dosis estándar de la Antitoxina 2 (del mismo lote que el implicado en el brote epidémico de la Granja A). Durante las siguientes 10-14 semanas, los animales fueron monitorizados diariamente para evaluar signos evidentes de enfermedad. Se recogieron semanalmente muestras de suero y se ensayaron para evaluar los signos bioquímicos de daños hepáticos y la cuantificación de los niveles séricos del TDAV.

A lo largo del transcurso del estudio, únicamente 1 de los 4 animales (el Caballo C1) mostró signos clínicos de la enfermedad. Los síntomas, que aparecieron aproximadamente entre 7 y 9 semanas después de la inoculación, incluían un breve periodo de leve letargia y apetito reducido, y parecían resolverse en < 1 semana. Coherente con la observación de los signos clínicos, el Caballo C1 tenía unos niveles elevados de las enzimas hepáticas en el suero que presentaban un pico en la semana previa a la aparición de la enfermedad (Fig. 6 B-E). Las enzimas hepáticas en el suero de los Caballos C2-C4 permanecían ampliamente sin cambios a lo largo de transcurso del estudio, con la excepción de una elevación temporal en los niveles de la GLDH y de la SDH en la semana 7 en el caballo C3.

Las dinámicas de la infección por el TDAV eran notablemente diversas entre los cuatro animales inoculados (Fig. 6A), en paralelo con las diferencias en las cargas víricas detectadas después del brote epidémico inicial (Fig. 5A). En

los Caballos C1 y C3, los niveles del TDAV ascendieron rápidamente y permanecieron elevados desde la semana 4 durante la duración del estudio. De forma importante, la carga vírica máxima próxima del Caballo C 1 anticipó la aparición del pico de los síntomas clínicos en al menos 5 semanas. De hecho, hubo tres semanas (semana 4 - semana 7) durante las cuales la carga vírica era máxima pero no había signos evidentes de daños hepáticos, según se valoró por los niveles de la AST, la GGT, la SDH o la GLDH. En el Caballo C4, la carga vírica aumentó gradualmente, y tuvo un pico después (semana 8) y a unos niveles menores que para los Caballos C1 o C3. En el Caballo C2, se detectó el TDAV desde la semana 2 en adelante; sin embargo, la carga vírica era muy baja con respecto a los otros animales y no aumentó sustancialmente a lo largo del transcurso del estudio.

7. La infección aguda por el TDAV puede convertirse en crónica

Se sabe que el GB y los hepacivirus causan una infección crónica en algunos individuos. Para analizar el potencial del TDAV para progresar a una cronicidad, se recogieron muestras séricas de treinta animales de la Granja A aproximadamente un año después del brote epidémico inicial de la enfermedad de Theiler. En ambos casos iniciales (los Caballos A1 y A2), que eran positivos para el TDAV y mostraban los signos clínicos de enfermedad durante el brote epidémico, el virus no fue detectable un año después (Fig. 7). De forma análoga, otros 10 animales que habían sido positivos para el TDAV durante el brote epidémico (incluyendo los Caballos A7 y A11, que tenían una carga vírica muy baja durante el brote epidémico) eran inequívocamente negativos para el virus después de un año. Por el contrario, cuatro caballos sin síntomas clínicos evidentes durante el brote epidémico continuaban portando el TDAV un año después, demostrando que el TDAV puede establecer una infección crónica en algunos, pero no en todos, los animales expuestos. Finalmente, todos los caballos que eran negativos para el TDAV durante el brote epidémico continuaron siendo negativos durante un año, indicando una ineficiente transmisión horizontal, si la hubiera, desde los animales infectados de la misma granja.

El anteriormente descrito ensayo diagnóstico del TDAV proporciona la detección y/o la identificación y/o la cuantificación del TDAV en una muestra biológica (por ejemplo, suero). Se empleó el ensayo diagnóstico del TDAV basado en una qPCR para cribar suero o plasma de 60 caballos de tres instalaciones geográficamente distantes (Fig. 5). Ninguno de los 20 animales del grupo de la Granja B había recibido antitoxina botulínica de ninguna fuente. Se preparó la Antitoxina botulínica 2 agrupando el plasma de tres caballos inmunizados con la toxina botulínica de la Granja D; estos tres caballos donantes comprenden el grupo de la Granja D. Finalmente, la Granja A, en la que se detectó el brote epidémico de hepatitis, proporciona muestras de 37 caballos. Algunos de los 37 animales de la Granja A pastaban en los campos habituales o estaban alojados en establos comunes. Estos caballos pueden clasificarse en tres subgrupos: 1) quince de estos caballos de la Granja A no habían sido tratados con antitoxina botulínica de ninguna fuente y servían como el subgrupo de la Granja A no tratado; 2) diecisiete caballos (incluyendo los caballos A1 y A2) de la Granja A habían recibido la Antitoxina 2 contaminada y comprendían el subgrupo de la Granja A tratado con la Antitoxina 2; y, 3) los restantes cinco caballos eran de animales que habían recibido la Antitoxina 1 y comprendían el subgrupo de la Granja A tratado con la Antitoxina 1. Por lo tanto, el ensayo diagnóstico descrito en el presente documento puede usarse, por ejemplo, para determinar: i) cómo se diseminan las infecciones por el TDAV en poblaciones de caballos; ii) para detectar una transmisión natural de animal a animal; iii) para determinar la correlación, si la hubiera, entre los síntomas clínicos y la viremia; y, iv) si las infecciones por el TDAV han desaparecido y/o se han establecido en forma de infecciones crónicas a largo plazo.

Según se describe en el presente documento, se utilizó una secuenciación paralela masiva y el subsiguiente cribado basado en los ácidos nucleicos para la identificación de un miembro muy divergente previamente desconocido de los *Flaviviridae* y para relacionarlo con un brote epidémico de la enfermedad de Theiler en caballos. Este virus, que hemos denominado *virus asociado a la enfermedad de Theiler* (TDAV), es el primer agente infeccioso en ser asociado inequívocamente con una hepatitis sérica aguda equina desde la primera descripción de la enfermedad en 1918. Diversas líneas de pruebas implican al TDAV como el agente causal de este brote epidémico de la enfermedad de Theiler en caballos. En primer lugar, el TDAV era el único virus común en todos los casos iniciales, y se detectaron pocas secuencias víricas que no fueran del TDAV en cualquiera de las muestras. En segundo lugar, aunque no todos los caballos positivos para el TDAV tenían hepatitis, el TDAV era detectable en todos los animales del brote epidémico con signos clínicos o bioquímicos de hepatitis. En tercer lugar, la positividad para el TDAV estaba asociada exclusivamente con antecedentes de exposición a la Antitoxina 2, lo que apoya la hipótesis de que era un contaminante infeccioso del producto sérico y no un virus que se encuentra habitualmente en las granjas de caballos. En cuarto lugar, el estudio de inoculación indicó que la infección por el TDAV precede a los daños hepáticos, excluyendo la posibilidad de que la asociación del virus con la hepatitis de la Granja A refleje una infección preferente de animales con un historial de daños hepáticos. Finalmente, la secuenciación del genoma del TDAV reveló un miembro de los *Flaviviridae*, que engloba otros virus de transmisión sanguínea relacionados con los daños hepáticos, incluyendo el HCV. Se aprecia que este estudio de inoculación no cumple formalmente los postulados de Koch, dado que el TDAV del inóculo no fue purificado en primer lugar mediante un cultivo *in vitro* (dado que todavía tenemos que desarrollar sistemas de cultivo adecuados). Como tal, la asociación del TDAV con la enfermedad de Theiler, aunque muy fuerte, sigue siendo ilativa. De forma análoga, queda por determinar si el TDAV es el único agente etiológico de la enfermedad de Theiler o uno de los diversos agentes causales – como es el caso en la hepatitis humana, que está relacionada con al menos cinco virus no relacionados (los virus de la hepatitis A-E). A este respecto, apreciamos que hemos sido incapaces de relacionar el NPHV, el único virus hepaciforme conocido detectado en caballos, con la hepatitis en este brote epidémico. Los ensayos paralelos de qRT-PCR para el ARN del NPHV llevados a cabo en este estudio identificaron el virus únicamente en tres caballos: un caballo asintomático sin

tratar negativo para el TDAV (Granja A), un caballo asintomático positivo para el TDAV (Granja A) y un caballo negativo para el TDAV sin ningún antecedente de tratamiento con la antitoxina (Granja B) (Tabla 7). Por supuesto, esto no excluye un papel del NPHV en la enfermedad hepática (o extrahepática) en otros escenarios epidemiológicos.

5

Tabla 7. Cribado del NPHV mediante una qPCR *

Caballo ID †	Ct promedio (D.T.) †	Solicitud de NPHV
A1	Indeterminado	Negativo
A2	Indeterminado	Negativo
A3	Indeterminado	Negativo
A4	Indeterminado	Negativo
A5	Indeterminado	Negativo
A6	Indeterminado	Negativo
A7	Indeterminado	Negativo
A8	Indeterminado	Negativo
A9	Indeterminado	Negativo
A10	Indeterminado	Negativo
A11	34,122558 (0,269914587)	Positivo
A12	Indeterminado	Negativo
A13	indeterminado	Negativo
A14	indeterminado	Negativo
A15	28,177337 (0,221504356)	Positivo
A16	indeterminado	Negativo
A17	indeterminado	Negativo
A18	indeterminado	Negativo
A19	indeterminado	Negativo
A20	indeterminado	Negativo
A21	indeterminado	Negativo
A22	indeterminado	Negativo
A23	indeterminado	Negativo
A24	indeterminado	Negativo
A25	indeterminado	Negativo
A26	indeterminado	Negativo
A27	indeterminado	Negativo
A28	indeterminado	Negativo
A29	indeterminado	Negativo
A30	indeterminado	Negativo
A31	indeterminado	Negativo
A32	indeterminado	Negativo
A33	indeterminado	Negativo
A34	indeterminado	Negativo
A35	indeterminado	Negativo
A36	indeterminado	Negativo
A37	indeterminado	Negativo
B1	indeterminado	Negativo
B2	indeterminado	Negativo
B3	indeterminado	Negativo
B4	indeterminado	Negativo
B5	indeterminado	Negativo
B6	indeterminado	Negativo
B7	indeterminado	Negativo
B8	indeterminado	Negativo
B9	indeterminado	Negativo
B10	indeterminado	Negativo
B11	indeterminado	Negativo
B12	indeterminado	Negativo
B13	33,9393255 (0,791101946)	Positivo
B14	indeterminado	Negativo
B15	indeterminado	Negativo
B16	indeterminado	Negativo
B17	indeterminado	Negativo
B18	indeterminado	Negativo

(continuación)

Caballo ID †	Ct promedio (D.T.) ÷	Solicitud de NPHV
B19	indeterminado	Negativo
B20	indeterminado	Negativo
D1	indeterminado	Negativo
D2	indeterminado	Negativo
D3	indeterminado	Negativo
Control positivo (plásmido)	8,85176075 (0,453810734)	Positivo
<p>* Burbelo, P. D., et al., 2012. Serology-Enabled Discovery of Genetically Diverse Hepaciviruses in a New Host. <i>Journal of Virology</i>. 86 (11): 6171. † Los identificadores de los caballos están codificados según la ubicación de la granja y un número único asignado a cada caballo muestreado para este estudio (A, Granja A en la que se produjo el brote epidémico; B, Granja B sin brote epidémico ubicada en un estado diferente; D, caballos donantes cuyo suero fue agrupado para crear el suero de Antitoxina 2 contaminado por el ETAV relacionado con el brote epidémico de la enfermedad de Theiler en la Granja A. ÷ C_t = umbral del ciclo. D.T. = desviación típica, n = 4.</p>		

- Los parientes más cercanos del TDAV parecen ser los virus GB. Los virus GB son un grupo de especies muy prevalentes de *Flaviviridae* que producen infecciones persistentes pero normalmente subclínicas en sus especies hospedadoras. Los virus GB A, B, y C fueron identificados en primer lugar en estudios de hepatitis sérica no A no B en seres humanos y en primates no humanos a principios de los años 90, aunque ninguno ha sido relacionado de forma inequívoca con daños hepáticos en seres humanos en posteriores investigaciones epidemiológicas (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 19; 100 (17): 9962-7. Publicación electrónica del 7 de agosto de 2003, Chronic hepatitis associated with GB virus B persistence in a tamarin after intrahepatic inoculation of synthetic viral RNA).
- El GBV-D, tampoco relacionado hasta ahora con la enfermedad, fue recientemente identificado en un estudio serológico de murciélagos frugívoros naturales de Asia central del sur. Tomando como base las similitudes observadas en la organización y la secuencia del genoma, el tropismo tisular, la ausencia de una patogenicidad detectable en los seres humanos y la persistente naturaleza de la infección, se propuso clasificar el GBV-A, el GBV-C y el GBV-D conjuntamente en un nuevo género de *Flaviviridae* denominado *pegivirus* (virus GB o G persistente). Actualmente, basándose en las características de la secuencia, el TDAV probablemente podría ser considerado un miembro del género *pegivirus* propuesto, aunque sería el primer miembro para el cual se ha identificado una asociación con la enfermedad. La pertenencia de un virus a un género dado no implica necesariamente a su hospedador natural. Aunque el TDAV ha sido descubierto en caballos, los reservorios y los hospedadoras naturales de este virus son desconocidos; podría ser un virus exclusivamente equino o un agente introducido en la población equina procedente de otra fuente y amplificado ahí mediante la práctica de la transfusión.
- La divergencia con respecto a los miembros de la familia *Flaviviridae* es evidente en varias interesantes características del genoma del TDAV. En primer lugar, el virus porta tres inserciones de aminoácidos en la proteína NS5A que abarca aproximadamente 160 aminoácidos que no se encuentran en ninguna de las especies relacionadas de hepacivirus o de virus GB. La NS5A del HCV es una fosfoproteína sin ninguna actividad enzimática conocida, pero con un papel esencial, aunque poco comprendido, en el ciclo vital del virus. La NS5A es necesaria para la replicación del ARN, el ensamblaje del HCV infeccioso y las interacciones con una diversidad de proteínas celulares; la proteína también es el objetivo de los más potentes inhibidores anti-HCV descubiertos hasta la fecha. La mayor inserción de la NS5A del TDAV reside en el equivalente del dominio I de la NS5A del HCV, una región de unión al cinc con actividad de unión al ARN; no se conoce la relevancia de las inserciones en el ciclo de vida del TDAV. En segundo lugar, el TDAV carece de un sitio de unión al microARN (miR)-122 en la UTR en 5' que se ha detectado en los hepacivirus. En los seres humanos, el miR-122 es un abundante miARN específico del hígado, que es esencial para la replicación del HCV. El papel, si lo hubiera, que juegan los miARN en la replicación del TDAV está por determinar.
- Aunque genéticamente distinto de los hepacivirus, el TDAV se parece al HCV en varios elementos de su biología, incluyendo la capacidad de engendrar infecciones tanto agudas como crónicas que pueden presentarse con una infección sintomática o asintomática. El TDAV es un virus de transmisión sanguínea que no mostraba ningún signo de transmisión horizontal a través del contacto normal entre caballos no infectados e infectados en la Granja A a lo largo de un año. En esto también se parece al HCV, que raramente es transmitido por un contacto humano casual no parenteral, y no se transmite de forma eficaz mediante un contacto sexual; de hecho, para el HCV al igual que para el TDAV, la exposición parenteral parece ser la vía de transmisión más eficaz. Por supuesto, la ausencia de transmisión horizontal del TDAV observada en este estudio no excluye totalmente su aparición, y la transmisión vertical también sigue siendo una posibilidad. Al igual que se observa para el HCV, los individuos positivos para el TDAV pueden estar asintomáticos durante periodos prolongados de tiempo. Adicionalmente, al igual que en el HCV, los niveles séricos del ARN del TDAV no se correlacionan fuertemente con la gravedad de la enfermedad clínica.

5 Esto puede indicar que la propia replicación del virus no es citocida, y que las lesiones en los hepatocitos, cuando estaban presentes, podrían ser el resultado de mecanismos inmunitarios o inflamatorios secundarios. Finalmente, las infecciones agudas por el HCV pueden desaparecer sin ninguna intervención en algunos individuos, aunque aproximadamente el 70 % puede progresar a cronicidad; en este estudio, observamos una tasa de cronicidad del TDAV de 4 de 17 (23,5 %) animales después de un año.

10 La disponibilidad de un ensayo diagnóstico del TDAV basado en una qRT-PCR y el futuro desarrollo de ensayos serológicos permitirán el cribado de productos biológicos equinos, así como investigaciones adicionales sobre la prevalencia y la exposición del TDAV. Estos estudios proporcionan un entendimiento del mundo en expansión de los *Flaviviridae* no primates, abren oportunidades para investigar un importante patógeno de los caballos, y proporcionan información crítica para el control y la potencial erradicación de la hepatitis sérica equina.

15 Con el fin de interpretar esta memoria descriptiva, se aplican las siguientes definiciones, y siempre que sea apropiado, los términos usados en singular incluirán también el plural, y viceversa. En el caso de que cualquier definición establecida a continuación entre en conflicto con el uso de esa palabra en cualquier otro documento, la definición establecida a continuación siempre prevalecerá para el fin de interpretar esta memoria descriptiva y sus reivindicaciones asociadas, salvo que se pretenda claramente un significado contrario. Se aprecia que, según se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la", incluyen los referentes plurales salvo que estén expresa e inequívocamente limitadas a un referente. El uso de "o" significa "y/o" salvo que se establezca de otro modo. El uso de "comprender", "comprende", "que comprende", "incluyen", "incluye" y "que incluye" son intercambiables y no pretenden ser limitantes. Adicionalmente, cuando la descripción de una o más realizaciones use el término "que comprende", los expertos en la materia deberían comprender que, en algunos casos específicos, la realización o realizaciones pueden describirse alternativamente usando el lenguaje que consiste esencialmente en "y/o "que consiste en". Los encabezamientos de sección usados en el presente documento son únicamente con fines organizativos y no deben ser interpretados como limitantes del asunto en cuestión descrito.

25 **LISTADO DE SECUENCIAS**

SEQ ID NO.: 1
nucleótido TDAV 120618

TGATACCGTGTCCCGGTACGACCTCGCGCGTCCCAAGCTCGCCCTGAGGGGGGAGCGT
 AAGGGCGCGTAGTGGGGTAGCCCCCAAACCGAGCCACCCTAGTGAGTGACTTTAGAAT
 GGTTAGGGAGACTACCGCCTTCGCTGTTTGGGGACCTAATGATCCGCGTGCCAGGGTTC
 TTCGGGTAAATCCCGGCGCGGTGTTTTGGGTTTCAGGGCAGTAGGGGCAGACGGGCCAGC
AGTCGCTGGTTCCTGGTACCACCACCCTATCCGGACGACCTCCCTCACGAAAGGTCGCC
ACGGTCTGTGGCTCGACGACGCCTATAATTCAGTCCGAGGGCGCAGCCCTCGTTAAAC
 TTAGGCAAGGTTCCCTCGCCATTGATTTGGCCAGGGGTTAAGTGAACGCCGCCCTTTTA
 ATGTTAATAGGGTCTTTCCCGGCGGGTTGACAAACACTTCCCTGGGCTCTTCGTTGG
 CCTCGGTTCCCTTGATGCTTCGGCACCCATGAGCGCACAGGGGGGGGACCCTGCGACAGT
 CCGCCAAGAGGAAAATCCTTCGGGTGACCTCGTGCGCAACCCAATCCCTTCTTCCA
 CATGGCGTGTCTGTGGTGCATGCTGTGATGGCGCCTTTCTTGTTGCTGGTCTTTTGTG
 CGGGGCCGGTGCTATCCGCGCCCCCGCCTCACACAAATGTTCTTCAAAGGCCGGTTTT
 ATCTGTCAAACCTGCTGTGATCCAAAGGACATACTGCTCTGCACCTACGACTTCTGCGTT
 ACCCGCGTTGGTTGTCATGTGTGCACAGAAGTTTGGTTGGAACGTCTCTCGTCCTGGCAT
 TTCTGTTCCAGCCGGTTCAGGTGATGTGGAGCCCGACCTTAAGGGGTTCTTCTCGGTCCG
 CTGCGGTGGGTGGCTATGCTGCCTCCCTCATCGGCCTCGGAGAGCCTTTTTCTGTCGGC
 TTGCTTGGCCTCACCATCCTTTACCGGGTTGATACTGGGGTTCCTGACGGGTTGCGTTG
 CGACAGACCTTGCAATGTGTGACAGTTCCTGTTGGCCCTCGTCCCTCGAGGGGATGCGGG
 TCTTGTGGGAAGTTGTCTGGGGTTTGTGTAACCGCATTCGACATGATTTGGGCAGCC
 TTTAACATCTTCGATGTGTGGTTGTTGGGTCTAGTCATCCTCCTTACCCTGGAGGGTCCG
 CTGGCACCTGGCGATCATGCTCGTCCTTGCCGCTGGCTTGTCTACTTCTAGTGCTGAAC
 TTGTTGGGGAGCCATGGGACTCATGCACCTGTAAGGGTGTGTTGGGTCTTAGGCACCTT
 AACGAGACTACTTCTCCATGTCTCTGTGAAAATGGCCCTTGGTACTATGATGCTGGTAC
 GCCAGGCCTCACCTCTTTCGAGAGGGGGGGTGGCTACTGTCTTCCCGATCGGTCCGCA
 GGTCCGGATGCTCGCTGTGGTGCCAGTGGGGATCGTGGGTTACTATCTACCCTCCCTCC
 TGGCCTAACGGCCGGCATTCTTGGCTCTGTAATTTGGCGGTGTTGGTGCAATGGTCGCCG
 ATGCTGGATTACCTGCCTCGTTGACGCACGTGACATTGGTGTGGTTCCTGCGTCCGCG
 ATTGTTGGGCTGAGACCGCTGATGATTCTCTTACCTTCGGGAACTGTGGCACTGGCCCT
 CGCGTCACTGCTAACTTAACCGCTTTCCCTTTGCACTATGGTCAGAAATCTACTGTTGC
TTTGGCTACTAAAATGGTCTTGACTGCTAAATTACAACCCTTGTGGAGGAATCTTAACA
CTACCATTATGTGCTCAGTTATTCGGACTTCTGTCCATTGCTTTAGTTGCATCGGCTTG
 CCGTCGCCTCCCGCGGGTTTGTGGGAGCGTGTCCCGGGCGAACCATTCTGATTGTGA
 AGGCGTGCAGGTTTCCACTGGTAAGCGGACTCCACATGCCCAACCAAGCAGAGGTGGA
 ATGCTACTGTGCACGTCTGCCCCGGTTACGCCTTCTACTCTCCCGCGTATGATGATGGC
 GAGCTTCATGTTGCTGGCTACTGGCAGTGGCTTTTGGCCGGACGCACCTATTCACTTTTG
 GTTTCTTGTAGATTTCCCTGCTTGTTTACTTGTCTTGATGCACCTCTCTGGTGCGCGCA
 TCACCCCTTTTTAGCCTGGCTCTTTGGATTCACTTGCGGGGGGGGGTCTTTGGATCC
 CCCACTCCGATACCTGGCTGCAAAAATAAGAATGAAGCCATCCACAACCTACACACTG
 TGTCCAGGCTCTTGGTACGCCATTAGCGTGGTGGTGAGGCGAGTGCGAATTATGCTG
 GTCACCTGGCTGCTACAGGGCCCGTTTACCGGTCTCTCGTGGATAGTCAACGCCACGTCCG
 TCCGCATTCAATATCACCTCCCATGCCTTGACCACTGTCCGGCTCTACACTGTCATCACT
 GGCTGAGGCTTGGATTCCCTTGGGCGGGCCCTCACATCCCTCGCTCCTTCCACAGGCA
 GTTTAGCGGCGGCGATCCTAGCGCCGTGCGCCTCTTGTGCTCCTGCCGCTTGGTTTAGC

GCAGCTCCCATGCTAGGCTGGGCGTTTCGCTATCCCACTTGGCACGAGTCCATTATGGC
TCTGCTTTTGGTCCCTGATTTACATGAGGTTTCGCCGGGGTCGCTCGGCTTGCCGCTCTGG
TACTTGGAAAGTTGACTCGCAACTTCGGCGCTGTTGGTGTGCTCGTCCTCCTAGTGCTT
GCGCGTAGGAAGACCAGTGCTTTGGGGTACGAGATCTGTATTTCCCTTACGGGCGAGGC
TGATTGGGACTGGTTGGATTTTTCTCCTGGCTCCTCTCGCTTCTGTTGCTTGGGCAG
TGCTTGCTCTCGCGTCCCTTACACCAGCAATGAAGAAGCGTAAGCTCCGATGGTACTCT
CGCTGGGCTTGGTGTACTCTCGGTTCACTCTCGTGGGTCGACCACACTCCATTCAACGG
TGTAGATCCCCTTTCTCGGAAGGCTTCTACTACTGGCTGTTTTCGGGTCTGGTTTGGC
CTAACGAGGTTGCCGTTGTGGTTGCCTCGTACGTCTTGATTGCCGTCTGGTTGACTTG
ACTGACATTTTACTAGAGACCCTCTTGTGTCAAATCCTGATCTGGGAAGGCTCGCGGT
GTTGTGTGACACCATCGCGGTCTCAGGTCTCCCTGGTTCCTCCATTGGGTTCTGGAGC
GCGCAGCTAGGCGTGGCATTACCTCTATCACCACCAGGGGCATTTGTCCGCACGGCTC
GCACAGTATCTCAGGGAGTTGGATGGTGCCTTGGAGCCGGCGGGTTACGCCGCAGGA
CTGCGAGTTTGTGCGCGACGCTCAGCGGATTCTTGAGTGTGGCCGCAATTATCGCGGGA
AGGCGGTTGTGCCCCGCAACGGTGACTGTCACTATTGGCGCCGTTTCGCGGGGCTGG
GAGCTCCCCCGGGTTTCGTGCTTACGGCCCCCTCATGCTTCGAAGCGTTGGCCGTGG
AGTCTGGCAGACGCTAGTGACGAGCATGATGGGGAAGGACAAGGAAGATCACACAGGCA
ATGTCCTTATCCTTGGGACCGCTGCCACCCGGTCAATGGGGACGTGCGTTCGGGGGGTG
GTTTACACCACATTCCACTCCTCCAACGGTTCGGACTTTGGCTGGGCCAACTGGGCCCT
AAATCCTCGGTGGTGGTTCGCCCTCGGACGACACCGCCGTGTACCCAATGCCTGTAGGCT
GCAGAAGTCTAGAGATTTGTGGATGTGGAGCCCGGAGCGCATGGGTACTGCGCAAGGAT
GGTGTCTAGTCCACGGTGAAGTGTTCCTGGACGTGAGATTAGACTGGATGTCGCTGG
TCGTGTTGCAGACTTTAAGGGCGCATCAGGTTACCCATACTCTGTGACCAGGGTCATG
CCATGGGTATGTTGACCGCGGTGTGCGATCGGGGGCCGGAAGTACACTCGGCCCTCTTT
GTCAAGCCGTGGGACAGCGTTCACAGGGATGCCCAAACGGTTACGGACGTGGGTGCACC
TCCTGCGGTACCTGGCAAAGGCAACTACGAGGAGCGATCCTTGTTCTTGCCCACTGGCA
CTGGCAAGTCCACCCTTGTCCCTGCCAATTATGCCAAGTCAGGCCACAAGACCTTGGTT
CTGAACCCGTCTGTTGCCACTGTTGCCGCCATGGGTCTTACATGAAGGACAAAATGGG
CATTACACCGTCCATCTTTGCTGGCCATGGGCCACCGCTATCTCGCGCAACACTGGGT
CTAACCTGGTGTACGCGACTTACGGTCGTTTCTTGCCCAAGCATAAGCAGTTGCTGGAC
GGTGTCTCTGTTATTCTTTGTGATGAGTGCCACAGCTCAGACCCGACAGTATTGTTGGG
TATTGGGCTGGTGCCTCTGAAGCGAAGAAGGCCGGAGTGAAGTCTCTCTTCGGTA
CAGCTACACCACCTGGCTATGCTACAGTCCCTCATAAGAATCATCAGGAGGCACCGGTT
GGGACGGATGGTGACATTCCATTCTATGGTTTCTACTTGAAGTCCACTAACTACACCAC
TGGCAGACATCTGATCTTTGTCCACTCTAAGAGTGAGGCGGAGCGCGTTCGCTCCGCTC
TACTGCTAAGGGCGTCAAAGCTATGTTCCACTACTCAGGTTCGGGATCCAACCGCAATC
CCCACCACTGGTAGTTTGACCGTAGTAGCCACCGATGCCCTTAACACAGGATACACAGG
TGACTTTGATACGGTGACGGACTGCAATGTGGCTGTGCAGGAAGAAGTTACCGTTGATC
TTGAACCTACCTTACCATTTCTCTTCGCACTCGGCCAGCTACGGCTGATCTGCGTGCC
CAGAGGAGGGGGCGTTGCGGTCGCGGCAGGCCTGGCCTGTACCGTTACTGTATAGCCTC
TTCCCCGCCTTGTGGCACGGTCCCATCCGGGGCCGTTTGGGCCGCTTTTGACGCTGCGC
TGACTTGGTACGATATTCAGCCCCGCCGCTGCGCGGTTGATTGGACTTTTTCAGAG
TGCCCTTACACCGGGCACATTGGCGTAAACTTGCAGGACCCCCAGCGGGTCTATGAGGT
CCTCGCTCCGTTTTCGCTGACGCCAGACGTAGTGAGAGCAAGGAACGCCGGGGTTCAGCT
GGCCCCCTCCTCGTTGGAGTCCAACGGTTCAGAGTGCAAGCGCTGCGCCTCAGGTCTCCT
TCCAACGCCCCCCACTGGCAGGGTTGGTTCGGCGATTGTGCCGTTCCGCTGCTTTACGC
CTTGGAGACTCAGAGGCCCGAGAGGGTAATCCGATCTCCATTGGTTCGATCAATTGGCTG

CGGCCTTGGGCGACTCTGTTACAGAGACGTCCTCTGGCCCCATCCTTTTGGCCGGCTTG
 GCGTTGGCTGCGGCCGCTGCTATTGCTGACTACACCGGGACTTTGGTGGTCGTTGGGAC
 CTTTGACGTGCGCCCTGGGGGGGCTCCGCGGCCTCCCAATCGCGCGATCTGCCCGGCG
 GATTATCATCAGGACAGCCACAGAGTGATGGCGAGGGGCCTCCCCCTCCCGTCGCACT
 GACCAGCTGACAGACTCCCAAACCTTGGACGCACTCCAGGATGTGATGACCCAGACATC
 GTGGGAGTGTCTGGATTATTGCTACCGGGTAGCGACCGGTACCCTGGCTCCTAGAACCG
 CCGACCGCTGGAAAGCGGGGCGCGTTGGCTTCGGGAGGCGTGCTGTGGACTAACCCCT
 CCCACTAGTCCATCCCAGGTGGGTGGGGGGTCACCCAACCCCTACCTCTCGGACACCT
 TGCTGTGAAGGCTTGGCAAACCTTGCTCAACAACCTTGGGTACTGCTATTTCCCTGGTCA
 CCGCGCCCTGGGCCGCTGGTAGTTCTCCTCCGCTTGCTTGTATCGCCTCAGCGTTGCTT
 GGGTTGCAAAGCGCGTTGCCGCTCGACGTGCGCCTCCCGGCCGCTCTCCTTGCTGGTGC
 CGGTGGCACTCTCTCGGAGATGCCGCCACTGGCTTGGGGATGGCCGCGTCGTTTCATGT
 TGGGTGGCACGGTTGGAACCGCTGGCCCTTTCATGTTCTACTTGAAGTCTTGGGGGGG
 TATGAGTCGACGGTGGTCGGCGCCTCCCTTGCAATTTGACCTTTTTTCTGGAAACGCTTC
 TATGTCAGACTTGGTTTACCTAATCCCTGCTCTCGGCTCACCTGGGCCCGCAGTCGCTG
 GCTTTGCCGTTGGCTTTGTTCTCACTTGGCTCTCGGTAAGGCTCCGTCTCGGGCCTGG
 TTGAACCGACTTCTTACTCTTTTACCTCGCTCGGTTCGCTTACCTCAGGACTTCTTTTT
 GGAGGAGGACGTGAGGGCTCGAGCTTCTGAGCTCCTGCGTTCCTTTCTATTAGTCGTT
 CTGTGTCTAAGCTCCTGGCTTCTGTTGGTGACAAGTACATCACTCGTACCTCTGGCAGC
 CTCTTCTGGGAGGTGCGAGCCACTGTGATCTCCTGGTTTAGGCGCCTGTTGGACTGGGT
 CACCTCCTGCGTGAAGGACCGGATGCCCTCTGTTCTGTGCCTATGTTGACCTGCCAGG
 CCGCTTACACTGGACCTTGGGTTGGTACTGGTACCGTCACTGGCCGTTGCGGCTGTGGC
 GCTGCCATCTCTGCTGACTTTCGAGGAGGGTGTTCGCGTTCGCTGGCACACTACTCATA
 TTTCTGCCGTTGGTACTTTGCCCGCGGCATTCTCTGAATACTCTTGGCACTACTTCAG
 GTCCCTCGCCCGGCCCCCAAGCTCGTGGGTCAACGGGCTATCCATCCCGTGGGGCTTACT
 GGCTACGTTGAGGTTTTGCGCGCGGAAACTGGTGAGGTAACAATCACTAGGACTACCGA
 GCATGATCTCACTCGTGACCAACTTCTCCACGCCTTACGCCAGCCGCCCTACCAGGTGG
 ATGGTGTGGTCTGTTCTCTCCGCTATTTCGGCTTCACTCATTGCCATGATTTACGGTCT
 GGTGCCGTTGTTGATTACGAAGGTCGGGCCATTACCCTCCCTCACACCGTCCCGGAGA
 TGGCGTCAATCCCGAGTATATCGGGACGGTCCGCCCTCGAAGGGGATGCTGTCCGGGAGG
 CTATGGCTGAACCAGAGGTTTGGCATGACACCACTGACCGTTTTTCTGACAGTGTGAG
 CCGGAAGAGCTTGAGCGCTTGACTCTCGGCTCCGAGGTTGAGTTGCCTCCGTTGGATCC
 GGAGGGACCAGGGTTCGTTCCGTCTGAGCGTACCTTCTTTGTGGCTTCCAATCCGCAAG
 GTGAGGTCGCCATCGAGAGGGACGTTGAGACGTTACTCCCCCTATTCTCCTGTTCCC
 CCGTTGGCTCCTTTGCCACGAGGCCGGTGGTCTTGCTCCACCTCCTTCTGATTCTGG
 CCCTTTGGGTACATCCGACTACCCAGCTACCTACTCTGACACCGGCTCTATGCCGCCGT
 TGGAGGGTGAGCTCCGTGGTTCGGGTGCATCCACTCCTATTTTCTGGCAGGAACCTACT
 CGTTTCTCCCATGTGCCTACATCTATTAGCATTGAGTCTACTGACAGGTCTATCGCTCA
 GGGGTTGCTCGACTCCGTCCGTTCTTCGGCTGAGGCATTGGCCGTTGCTACTGAAGTTG
 TTAATCGCAGCTTCTCACACCTGCTCTTTGCCATGAAGCGCTCCATGGTCTGGCGCC
 TTGGTGGCTTCACTCCCGCCGCGGACCCCGAGGTTGCCTCGGTTCGCTTCCACACCCGA
 GCCTGACACTGTTTCATGGCGCGGTTGCGGTGGCGGCCAGACGGCGTTGGGGACTGTTG
 CGGCGCCCTTGACGGCTGCCACTGGCAATAGTTCCGGGGAGGCTTCTCCTGTGCTCCCT
 GAACCCAGGTGCGGGTGTGCACTTGACTGCTCCTTGTTTTCAATCATGATGGGGATGT
 TCTTTGTACTTCGGCTGACATCACCTTGGCCGAGTTTTGGTGCATGCCGGGGGGCGTT
 TTAACACCGGCACAGCTTCTGGGTCAATGGTGTAGGCGCAGGGGCACCACTCGCGTG
 GCGTCCCTGTGTGACACTGCTGTCTCAGTTACTGTTAGGTGCAATTCTCCCTCGGGCTC

TTCTTGCAGCCAAACATCACTTCCTCCTGCTGAACCTGCTGTGCGGAGCCCTAGCCCTA
 GGGCCCCGCGCGGCGTGCACATCAGTTGGACTTGCTGCCAAAATCGTTCCTACCGTGGT
 TTTTACTCAGGAAACTTTACCATTTCTGACATTTGTGATGGGTTTGCCATCTTTCCAGA
 CTCTCCACCTCTTCTTCCATGGGAACCGGGTGTGACACTCGAGACTCGTGTGAGG
 AACTGGAGGGAGAACAGATTGAGATTCAGTACACCTGCAGACATGAGACCGAACCCGTC
 TCTCGCTGCGTGAGGTCGTACATTTGGTACGGTGTTCGGCTACGGGTGGTGAGAGCCG
 CCCTGTACCGGTCACCCGCCCAATTGGATCCTTCATGCGCGCGGACGCTACTCGTGCTT
 ACGTCACGCAGATGTCTGAAGTTGGGAACCGTATTGAGAAAGTCACCATTGAGCAGACG
 ATTGCCCTTGAGGATCAGTTCCTTATGGATCGCTACAACCTTGCCCTTGCCAGGGCTAA
 GAATGGCGGTCCGTATCGGGGCTGGTCTTATGAAGAGGCTGTGGCCAAGGTTCCGCCCTC
 GGGCTGCCGCTGGCCATAACGTCAAGCTCTCTGTTGCCGATCTCAAACGCCCTGCCGGT
 CGGAAAATCGTGGAGGACACCATCCAGTCTATTGCTGGTGGAGCGTATGAACATCCTTT
 CATGCTTACAGCTAAGTCTGAGGTGTTTTTCCAAGATAAGAAGACTCGCAAGCCACCTC
 GGCTGCTCTGTTACCCCTCATTGGAGTTTAGAGTGGCTGAGAAAATGATCCTAGGCGAC
 CCTGGCTTGGTAGCCAAGGCCGTCCTGGGTGATGCATATGGTTTCCAGTACACCCCCCA
 ACAACGGGTAGAAAACACTCTCTCTCTGGGATGAGAAGCAAATAACCCATTGCTATCA
 CGGTTGACGCCAAGTGCTTTGATTCACCATCACGGCGTTTGATGTGACCCGAGAAGCT
 GAAATCTATGCCATTGCCCATGAGAAACCAGATCTGGTTCGCGCTCTCCATCGGCACTA
 TAAGGCAGGTCCTATGGTGAACCGTGAGGGCGTTGAGGTTGGTTACCGTAACTGCCGCC
 CATCTGGCATTACACCACTTCTGCTTCTAATTCATTACTTGCTGGATCAAGGTGGGT
 GCCGCTGTCGTAAGATAGGCCTTAGGAATCCTTCCTCCTCATCCACGGTGATGACTG
 TGTCATTATCGCGGAGAGGGGAGACGAGGACCTACACCTGCTTTGCGTGCAGCTTTGC
 TGGAATATGGGTATGACTCAGATCCTGCACTCCACGCTTCGCTGGACGAGGCGGAGTCA
 GCTTCCACTTCTTGGCTGAGTGCACGGCGGGTTACGACCCGCGTAAGATTTATTTCT
 TTCCACTGACTTCCGGAAGGTACTTGCGAGGGCTACGTCTGAGTACGGAGACCCGGTCCG
 CTTCTGCGTGTGGTTACACCTTGCTCTATCCGTGGCACCCCTTGACTAGGTGGGTCCCTA
 ATGGCGCAGGTCATTGGACTCCCCTTTTTAAGGGGTGCCTCGGTGGACGAGGCAATCAC
 GTGCGAGGTGGCTGGTAACCGTCTCACGTTTTCTCTCAAGCAGCTGCCATCCATCCTGG
 TGGCCCTGCATGGCCCCGAGTGCTTGCGCGTCTCTGACTCCAATAAGACCCTCAGG
 GAGACAAACAATGCGCTTCAGGCCCTCAGAATGCGGGGGCTTTCCTGGTACCGGAAGAG
 GACTATTGCTCTCAGGCTTAAAATGATCAGAGCTGGTGGGCAGTGGGCGAAGTTGGCCA
 AGGCTCTCATCTGGCCTCCTTCTGCCTACATCCCATCGTTGGAGGTTGACACCTTCGAC
 GCAACCCAGCTTTTGGACATTATGAGCAGGCCCTATAACAACCTTGAGCTCCAGATTGG
 CAAGCCGATTTCGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 GTTCTGACATTCCTGCTACCTTAGCCGAAAGGTATGCACTTGGTCTGTTTTGGTCCGGT
 TGGGCTCTCGCCGGCTACTGGCTTCTGTTCTGGGTGTGAGCCCCTAGTTTACTAGCACC
 CTTTACAGTTTTCTACTAAACATGATTGTTTGTAGTCCAAGGCAACAGGCTTCGGCC
 GGGGAGTAGCGCCCCCCCCCTTGTGAGCTCGTAACCCCTTTTGGGGCTGTTCTCCC
 TGGGAAGAGGAGCAGTACATCCCCGGCTGGCAGCCGTTAATTGCTACGTGGTGGTTATA
 GCCCGGCAAGGTTAACAGGGGGAGTAGTGCCCCCCCCGCCCAACTCGGGTAGCGCGTA
 CGCTCGTCCGTCCTCCGACGTTAAAGAACCTGGCCT

SEQ ID NO.: 2
 Secuencia codificante de SEQ ID NO.: 1

5

ATGGCGCCTTTCTTGTGCTGGTTCTTTTGTGCGGGGCCGGTGCTATCCGCGCCCCCGC
 CTCACACAAATGTTCCCTTCAAAGGCCGGTTTTATCTGTCAAACCTGCTGTGATCAAAGG
 ACATACTGCTCTGCACTTACGACTTCTGCGTTACCCGCGTTGGTTGTCATGTGTGCACA

GAAGTTTGTGGAACGTCTCTCGTCCCTGGCATTCTGTTCGACCCGGTTCAGGTGATGT
 GGAGCCCGACCTTAAGGGGTTCTTCTCGGTGCTGCGGTGGGTGGCTATGCTGCCTCCC
 TCATCGGCCTCGGAGAGCCTTTTTCTGTGGCTTGTTCGGCCTCACCATCCTTTACCGG
 GTTGATACTGGGGTTCCTGACGGGTGCGTTGCGACAGACCTTGCAATGTGTCAGTTCC
 CGTTTGGCCCTCGTCCCTCGAGGGGATGCGGGTCTTGTGGGAAGTGTCTGGGGTTTGC
 TGTACCGCATTCCGCACATGATTTGGGCAGCCTTTAACATCTTCGATGTGTGGTTGTTG
 GGTCTAGTCATCCTCCTTACCCTGGAGGGTCTGCTGGCACCTGGCGATCATGCTCGTCCT
 TGCCGCTGGCTTGTCTACTTCTAGTGCTGAACTTGTGGGGAGCCATGGGACTCATGCA
 CCTGTAAGGGTGTGTGGGTCTTAGGCACCTTAACGAGACTACTTCTCCATGTCTCTGT
 GAAAATGGCCCTTGGTACTATGATGCTGGTACGCCAGGCCTCACCTCTTTCGAGAGGGG
 GGGTGGCTACTGTCTTCCCGATCGGTCCGCAGGTCCGGATGCTCGCTGTGGTGCCAGT
 GGGGATCGTGGGTACTATCTACCCTCCCTCCTGGCCTAACGGCCGGCATTCTTGGCTC
 TGTAAATTGGCGGTGTTGGTGCAATGGTCGCCGATGCTGGATTACCTGCCTCGTTGACGC
 ACGTCGACATTGGTGTGGTTCCCTGCGTCCGCGATTGTTGGGCTGAGACCGCTGATGATT
 CTCTTACCTTCGGGAACTGTGGCACTGGCCCTCGCGTCACTGCTAACTTAACCGCTTTC
 CCTTTCGACTATGGTCAGAAATCTACTGTTGCTTTGGCTACTAAAATGGTCTTGACTGC
 TAAATTACAACCTTGTGGAGGAATCTTAACACTACCATTATGTGCTCAGTTATTCCGA
 CTTCTGTCCATTGCTTTAGTTGCATCGGCTTGCCTCGCCTCCCGCGGGTTTGTGGGAG
 CGTGTCCCGGGCGAACCATTCTGATTGTGAAGGCGTGCAGGTTTCCACTGGTAAGCG
 GACTCCACATGCCCAACCAAGCAGAGGTGGAATGCTACTGTGCACGTCTGCCCCGGTT
 ACGCCTTCTACTCTCCCGCGTATGATGATGGCGAGCTTCATGTTGCTGGCTACTGGCAG
 TGGCTTTTGGCCGGACGCACTATTCACTTTTGGTTTTCTTGTAGATTCCTGCTTGTTTA
 CTTGTTCTTGATGCACCTCTCTGGTGCAGCATCACCCCTTTTTAGCCTTGGCTCTTT
 GGATTCACTTGCGGGGGGGGTCTTTGGATCCCCACTCCGATACCTGGCTGCAAAAAT
 AAGAATGAAGCCATCCACAACACTACACACTGTGTCCAGGCTCTTGGTCCAGCCATTAG
 CGTGGTTGGTGAGGCGAGTGCGAATTATGCTGGTCACTGGCTGCTACAGGGCCCGTTA
 CCGGTCTCTCGTGGATAGTCAACGCCACGTGCTCCGCATTCAATATCACCTCCCATGCC
 TTGACCACTGTCCGCTCTACACTGTCACTGGCTGAGGCTTGGATTCCCTTGGGCGG
 GGCCTCACATCCCTCGTCCCTCCACAGGCAGTTTAGCGGCGGGCGATCCTAGCGCCGT
 GCGCCTCTTGTGCTCCTGCCGCTTGGTTTAGCGCAGCTCCCATGCTAGGCTGGGCGTTT
 CGCTATCCCACTTGGCACGAGTCCATTATGGCTCTGCTTTTGGTCTGATTTACATGAG
 GTTCGCCGGGGTGCCTCGGCTTGGCCTCTGGTTACTTGGAAAGTTGACTCGCAACTTCG
 GCGCTGTTGGTGTGCTCGTCCCTAGTGCTTGGCGTAGGAAGACCAGTGCTTTGGGG
 TACGAGATCTGTATTTCCCTTACGGGCGAGGCTGATTGGGACTGGTTGGATTTTCTC
 CTGGCTCCTCTCGCTTCTGTTGCTTGGGCAGTGCTTGTCTCGCGTCCCTTACACCAG
 CAATGAAGAAGCGTAAGCTCCGATGGTACTCTCGCTGGGCTTGGTGTACTCTCGTTT
 ATCTCGTGGGTCGACCACACTCCATTCAACGGTGTAGATCCCCTTCTCGGAAGGCTTC
 CTACTACTGGCTGTTTGCGGGTCTGGTTGGCCTAACGAGGTTGCCGTTGTGGTTGCCT
 CGTACGTCTTGATTGCCGTCGTGGTTGACTTGACTGACATTTACTAGAGACCTCTTG
 TTGTCAAATCCTGATCTGGGAAGGCTCGCGGTGTTGTGTGACACCATCGCGGGTCTCAG
 GTCTCCCTGGTTCCCTCCATTGGGTTCTGGAGCGCGCAGCTAGGCGTGGCATTACCTCT
 ATCACCACCAGGGGCATTTGTCCGCACGGCTCGCACAGTATCTCAGGGAGTTGGATGGT
 GCCTTGGAGCCGGCGCGGGTTACGCCGAGGACTGCGAGTTTGTGCGCGACGCTCAGCG
 GATTCTTGAGTGTGGCCGCAATTATCGCGGGAAGGCGGTTGTTGCCCGCAACGGTGACA
 CTGTCATCATTGGCGCCGTTCCGCGGGCCTGGGAGCTCCCCCGGGTTCGTGCTTACG
 GCCCCCTCATGCTTCGAAGCGTTGGCCGTGGAGTCTGGCAGACGCTAGTGACGAGCAT
 GATGGGGAAGGACAAGGAAGATCACACAGGCAATGTCCTTATCCTTGGGACCGCTGCCA

CCCGGTCAATGGGGACGTGCGTTCGGGGGGGTGGTTTACACCACATTCCACTCCTCCAAC
 GGTCCGACTTTGGCTGGGCCAACTGGGCCCCTAAATCCTCGGTGGTGGTCCGCCCTCGGA
 CGACACCGCCGTGTACCCAATGCCTGTAGGCTGCAGAAGTCTAGAGATTTGTGGATGTG
 GAGCCCGGAGCGCATGGGTACTGCGCAAGGATGGTGTCTTAGTCCACGGTGAAGTGT
 CCTGGACGTGAGATTAGACTGGATGTGCTGGTCTGTGTCAGACTTTAAGGGCGCATC
 AGGTTACCCATACTCTGTGACCAGGGTTCATGCCATGGGTATGTTGACCGCGGTGTGCG
 ATCGGGGGCCGGAAGTACACTCGGCCCTCTTTGTCAAGCCGTGGGACAGCGTTCCCAGG
 GATGCCCAAACGGTTACGGACGTGGGTGCACCTCCTGCGGTACCTGGCAAAGGCAACTA
 CGAGGAGCGATCCTTGTCTTGGCCACTGGCACTGGCAAGTCCACCCTTGTCCCTGCCA
 ATTATGCCAAGTCAGGCCACAAGACCTTGGTTCTGAACCCGTCTGTTGCCACTGTTGCC
 GCCATGGGTCCCTTACATGAAGGACAAAATGGGCATTACACCGTCCATCTTTGCTGGCCA
 TGGGCCACCGCTATCTCGCGCAACACTGGGTCTAACCTGGTGTACCGGACTTACGGTC
 GTTTCTTGGCCAAGCATAAGCAGTTGCTGGACGGTGTCTCTGTTATTCTTTGTGATGAG
 TGCCACAGCTCAGACCCGACAGTATTGTTGGGTATTGGGCTGGTGCCTCTGAAGCGAA
 GAAGGCCGGAGTGAAGTCTTCTTTCGGTACAGCTACACCACCTGGCTATGCTACAG
 TCCCTCATAAGAACATCACGGAGGCACCGGTTGGGACGGATGGTGCATTCCATTCTAT
 GGTTCCTACTTGAAGTCCACTAACTACACCACTGGCAGACATCTGATCTTTGTCCACTC
 TAAGAGTGAGGCGGAGCGGTCCGCTCCTACTGCTAAGGGCGTCAAAGCTATGT
 TCCACTACTCAGGTTCGGGATCCAACCGCAATCCCCACCACTGGTAGTTTGACCGTAGTA
 GCCACCGATGCCCTTAACACAGGATACACAGGTGACTTTGATACGGTGACGGACTGCAA
 TGTGGCTGTGCAGGAAGAAGTTACCGTTGATCTTGAACCTACCTTACCATTCTCTTC
 GCACTCGGCCAGCTACGGCTGATCTGCGTGCCAGAGGAGGGGGCGTTGCGGTTCGCGGC
 AGGCCCTGGCCTGTACCGTTACTGTATAGCCTCTTCCCCGCTTGTGGCACGGTCCCATC
 CGGGGCCGTTTGGGCCGCTTTTGGACGCTGCGCTGACTTGGTACGATATTCAGCCCGCCG
 CCGCTGCGCGGTTGATTGGACTTTTTCAGAGTGCCCTTACACCGGGCACATTGGCGTA
 AACTTGCAGGACCCCCAGCGGGTCTATGAGGTCTCGCTCCGTTTTCGCTGACGCCAGA
 CGTAGTGAGAGCAAGGAACGCCGGGGTTCAGCTGGCCCCCTCCTCGTTGGAGTCCAACGGT
 CAGAGTGCAAGCGCTGCGCCTCAGGTCTCCTTCCAACGCCCCCACTGGCAGGGTTTG
 GTCGGCGATTGTGCCGTTCCGCTGCTTTACGCCCTGGAGACTCAGAGGCCCGAGAGGGT
 AATCCGATCTCCATTGGTTCGATCAATTGGCTGCGGCCTTGGGCGACTCTGTTACAGAGA
 CGTCTCTGGCCCCATCCTTTTGGCCGGCTTGGCGTTGGCTGCGGCCGCTGCTATTGCT
 GACTACACCGGGACTTTGGTGGTCTGTTGGGACCTTTGACGTGCGCCCTGGGGGGGCTCC
 GCGGCCTCCCCAATCGCGCGATCTGCCCGGCGGATTATCATCAGGACAGCCACAGAGTG
 ATGGCGAGGGGCTCCCCCTCCCCGTGCACTGACCAGCTGACAGACTCCCAAACCTTG
 GACGCACTCCAGGATGTGATGACCCAGACATCGTGGGAGTGTCTGGATTATTGCTACCG
 GGTAGCGACCGGTACCCTGGCTCCTAGAACCGCCGACGCGCTGGAAAGCGGGGCGCGTT
 GGCTTCGGGAGGCGTGCTGTGGGACTAACCTCCCCTAGTCCATTCCCAGGTGGGTGG
 GGGGTCACCCAACCCCTACCTCTCGGACACCTTGCTGTGAAGGCTTGGCAAACCTTGCT
 CAACAACCTGGGTACTGCTATTTCCCTGGTACCGCGGCCTGGGCCGCTGGTAGTTCTC
 CTCCGCTTGTGTTGATCGCCTCAGCGTTGCTTGGGTTGCAAAGCGCGTTGCCGCTCGAC
 GTGCGCCTCCCGGCCGCTCTCCTTGCTGGTGGCGGTGGCACTCTCTTCGGAGATGCCGC
 CACTGGCTTGGGGATGGCCGCGTCGTTTCATGTTGGGTGGCACGGTTGGAACCGCTGGCC
 CTTTCATGTTCTACTTGAAGTCTTGGGGGGGTATGAGTCGACGGTGGTTCGGCGCCTCC
 CTTGCATTTGACCTTTTTTCTGGAAACGCTTCTATGTCAGACTTGGTTTACCTAATCCC
 TGCTCTCGGCTCACCTGGGCCCGCAGTCGCTGGCTTTGCCGTTGGCTTTGTTCTCCACT
 TGGCTCTCGGTAAGGCTCCGTCTCGGGCCTGGTTGAACCGACTTCTTACTCTTTTACCT
 CGCTCGGTTCGCTTTACCTCAGGACTTCTTTTTGGAGGAGGACGTGAGGGCTCGAGCTTC

TGAGCTCCTGCGTTCCTTTCTATTAGTCGTTCTGTGTCTAAGCTCCTGGCTTCTGTTG
 GTGACAAGTACATCACTCGTACCTCTGGCAGCCTCTTCTGGGAGGTTCGACGCCACTGTG
 ATCTCCTGGTTTAGGGCGCCTGTTGGACTGGGTACCTCCTGCGTGAAGGACCGGATGCC
 CTCIGTTCCTGTGCCATGTTGACCTGCCAGGCCGCTTACACTGGACCTTGGGTTGGTA
 CTGGTACCGTCACTGGCCGTTGCGGCTGTGGCGCTGCCATCTCTGCTGACTTCGAGGAG
 GGTGTTCCGCTTCGCTGGCACACTACTTCATATTTCTGCCGTGGGTACTTTGCCCGCGG
 CATTCTCTGAATACTCTTGGCACTACTTCAGGTCTCGCCCGGCCCCCAAGCTCGTGG
 GTCACCGGGCTATCCATCCCGTGGGGCTTACTGGCTACGTTGAGGTTTTGCGCGCGGAA
 ACTGGTGAGGTAACAATCACTAGGACTACCGAGCATGATCTCACTCGTGACCAACTTCT
 CCACGCCTTACGCCAGCCGCCCTACCAGGTGGATGGTGTGGTCTGTTCTCTCCGCTATT
 CGGCTTCACTCATTGCCATGATTTACGGTCTGGTGGCGTTGTTGATTACGAAGGTCCG
 GCCATTACCTCCCTCACACCGTCCCCGGAGATGGCGTCAATCCCGAGTATATCGGGAC
 GGTCCGCCCTCGAAGGGGATGCTGTCCGGGAGGCTATGGCTGAACCAGAGGTTTGGCATG
 ACACCACTGACCGTTTTTCTGACAGTGTGAGCCGGAAGAGCTTGAGCGCTTGA CTCTC
 GGCTCCGAGGTTGAGTTGCCCTCCGTTGGATCCGGAGGGACCAGGGGTCTGTTCCGCTCTGA
 GCGTACCTTCTTTGTGGCTTCCAATCCGCAAGGTGAGGTCGCCATCGAGAGGGACGTTG
 AGACGCTTACTCCCCCTATTCCTCCTGTTCCCCCGTTGGCTCCTTTGCCACGAGGCCG
 GTGGTCTTGCCTCCACCTCCTTCTGATTCTGGCCCTTTGGGTACATCCGACTACCCAGC
 TACCTACTCTGACACCGGCTCTATGCCGCCGTTGGAGGGTGAGCTCCGTGGTTCCGGGTG
 CATCCACTCCTATTTTCTGGCAGGAACCTACTCGTTTCTCCCATGTGCCTACATCTATT
 AGCATTGAGTCTACTGACAGGTCTATCGCTCAGGGGTGCTCGACTCCGTCCGTTCTTC
 GGCTGAGGCATTGGCCGTTGCTACTGAAGTTGTTAATCGCAGCTTTCTCACACCTGCTC
 TTTGCCATGAAGCGCTCCATGGTTCTGGCGCCTTGGTGGCTTCACTCCCGCCCGCGGAC
 CCCGAGGTTGCCTCGGTCCGCTTCCACACCCGAGCCTGACACTGTTTATGGCGCGGTTGC
 GGTGGCGGCCAGACGGCGTTGGGGACTGTTGCGGCGGCCTTGACGGCTGCCACTGGCA
 ATAGTTCGGGGGAGGCTTCTCCTGTGCTCCCTGAACCCAGGTGCGGGTTGTGCACTTG
 ACTGCTCCTTGTTTCAATCATGATGGGGATGTTCTTTGTACTTCGGCTGACATCACCTT
 GGCCGGAGTTTGGTGCATGCCGGGGGGCGTTTTAAACCACCGGCACAGCTTCTGGGTCA
 ATGGTGTTAGGCGCAGGGGCACCACTCGCGTGGCGTCCCTGTGTGACACTGCTGTCTCA
 GTTACTGTTAGGTGCAATTCTCCCTCGGGCTCTTCTTGCAGCCAAACATCACTTCTCTCC
 TGCTGAACCTGCTGTGCGGAGCCCTAGCCCTAGGGCCCCGCGCGGCGTGCACATCAGTT
 GGACTTGCTGCCAAAATCGTTCCTACCGTGGTTTTTACTCAGGAACTTTACCATTCT
 GACATTTGTGATGGGTTTGGCATCTTTCCAGACTCCTCCACCTCTTCTTCCATGGGAA
 CCGGGTGTGACACTCGAGACTCGTGTGAGGAACTGGAGGGAGAACAGATTGAGATTG
 AGTACACCTGCAGACATGAGACCGAACCCGTCTCTCGCTGCGTGAGGTGCTACATTTGG
 TACGGTGTTCGCTACGGGTCCGTGAGAGCCGCCCTGTACCGGTACCCGCCCAATTGG
 ATCCTTCATGCGCGCGGACGCTACTCGTGCTTACGTACGCAGATGTCTGAAGTTGGGA
 ACCGTATTGAGAAAGTCACCATTGAGCAGACGATTGCCTTGGAGGATCAGTTCCTTATG
 GATCGCTACAACCTTGGCCCTTGGCAGGGCTAAGAATGGCGGTCCGTATCGGGGCTGGTC
 TTATGAAGAGGCTGTGGCCAAGGTTCCGCCCTCGGGCTGCCGCTGGCCATAACGTCAAGC
 TCTCTGTTGCCGATCTCAAAACGCCTGCGGGTCCGAAAATCGTGGAGGACACCATCCAG
 TCTATTGCTGGTGAGCGTGATGAACATCCTTTCATGCTTACAGCTAAGTCTGAGGTGTT
 TTTCCAAGATAAGAAGACTCGCAAGCCACCTCGGCTGCTCTGTTACCCCTCATTGGAGT
 TTAGAGTGGCTGAGAAAATGATCCTAGGCGACCCTGGCTTGGTAGCCAAGGCCGTCCTG
 GGTGATGCATATGGTTTTCCAGTACACCCCCCAACAACGGGTTAGAAACTACTCTCTCT
 CTGGGATGAGAAGCAAATACCCATTGCTATCACGGTTGACGCCAAGTGCTTTGATTCCA
 CCATCACGGCGTTTGTGTCGACCGAGAAGCTGAAATCTATGCCATGCCCATGAGAAA

CCAGATCTGGTTCGCGCTCTCCATCGGCACTATAAGGCAGGTCCTATGGTGAACCGTGA
 GGGCGTTGAGGTTGGTTACCGTAACTGCCGCCCATCTGGCATTACACCACTTCTGCTT
 CTAATTCATTACTTGCTGGATCAAGGTGGGTGCCGCTGTGCGTAAGATAGGCCTTAGG
 AATCCTTCCTTCCTCATCCACGGTGATGACTGTGTGATTATCGCGGAGAGGGGAGACGA
 GGACCCTACACCTGCTTTGCGTGCAGCTTTGCTGGAATATGGGTATGACTCAGATCCTG
 CACTCCACGCTTCGCTGGACGAGGCGGAGTCAGCTTCCACTTCTTGGCTGAGTGCACG
 GCGGGTTACGACCCGCGTAAGATTTATTTCCCTTTCCACTGACTTCCGGAAGGTACTTGC
 GAGGGCTACGTCTGAGTACGGAGACCCGGTTCGCTTCTGCGTGTGGTTACACCTTGCTCT
 ATCCGTGGCACCCTTTGACTAGGTGGGTCTAATGGCGCAGGTCATTGGACTCCCCTTT
 TTAAGGGGTGCCTCGGTGGACGAGGCAATCACGTGCGAGGTGGCTGGTAACCGTCTCAC
 GTTTCCTCTCAAGCAGCTGCCATCCATCCTGGTGGCCCTGCATGGCCCCGGAGTGCTTGC
 GCGTCGTCTGACTCCAATAAGACCCTCAGGGAGACAAACAATGCGCTTCAGGCCCTC
 AGAATGCGGGGGCTTTCCTGGTACCGGAAGAGGACTATTGCTCTCAGGCTTAAAATGAT
 CAGAGCTGGTGGGCAGTGGGCGAAGTTGGCCAAGGCTCTCATCTGGCCTCCTTCTGCCT
 ACATCCCATCGTTGGAGGTTGACACCTTCGACGCAACCCAGCTTTTGGACATTATGAGC
 AGGCCCTATAACAACCTTGAGCTCCAGATTGGCAAGCCGATTCGTGCGTTCGCTGACTGG
 ACTCTTTGTGTCTAGGATCTGTTCTTTTTTTGGTTCTGACATTCCTGCTACCTTAGCCG
 AAAGGTATGCACTTGGTCTTGTTTTGGTTCGGTTGGGCTCTCGCCGGCTACTGGCTTCTG
 TTCTGGGTG

SEQ ID NO.: 3
 poliproteína TDAV 120618
 codificada por SEQ ID NO.: 2

5

MAPFLLLVLLCGAGAIRAPASHKCSFKGRFYLSNCCDPKDI LLCTYDFCVTRVGCHVCT
 EVCWNVSRPGISVRPGSGDVEPDLKGGFFSVAAVGGYAA SLIGLGEFFSVGLLGLTILYR
 VDTGVPDGLRCRDRPCNVSVPVWSSLEGMRVLWEVWGLLYRI PHMIWAAFNI FDVWLL
 GLVILLTLEGRWHLA IMLVLAAGLSTSSAELVGE PWDSCTCKGVVGLRHLNETTS PCLC
 ENGPWYYDAGTPGLTSFERGGGYCPSRSVRRSGCSLWCQWGSWVTI YPPSWPNGRHSWL
 CNWRCWCNGRRCWITCLVDARRHWC GSCVRDCWAETADDSLTFGNCGTGPRVTANLTA
 PLHYGQKSTVALATKMVL TAKLQPLWRNLNTTIMCSVIRTSVHCFSCIGLPSPPAGLWE
 RVPGEPI SDCEGVQVSTGKRTPPTCPTKQRWNATVHVCPGYAFYSPAYDDGELHVAGYQW
 WLLAGRTIHFVFLVDFLLVYLFMLHLSGARITPFLALALWIHLRGGVFGSPTPI PGCKN
 KNEAIHNYTHCVQALGHAI SVVGEASANYAGHWLLQGPFTGLSWIVNATSSAFNITSHA
 LTTVGSTLSSLAEAWIPLGGASHPLAPSTGSLAAAI LAPCASCAPAAWFS AAPMLGWAF
 RYPTWHESIMALLLVLIYMRFAGVARLAALVTWKLTRNFGAVGVLVLLVLARRKTSALG
 YEICISLTGEADWDWLD FSSWLLSLLFAWAVLALASLTPAMKKRKL RWYSRWAWCYSRF
 ISWVDHTPFNGVDPLSRKASYWLEAGLVWPNEVAVVVASVVLIAVVVDLTDILLETLL
 LSNPDLGR LAVLCDTIAGLRSPWFLHWVLER AARRGIYLYHHQHLSARLAQYLRELDG
 ALEPARVTPQDCEFVRDAQRILECGRNYRGKAVVARNGDTV IIGAVRGAWELPPGFVLT
 APLMLRSVGRGVWQTLVTSMMGKDKEDHTGNVLI LGTAATRSMGT CVGGVVYTTFHSSN
 GRTL AGPTGPLNPRWWS PSDDTAVYPMPVGC RSLEICCGARS AWVLRKDGALVHGELF
 PGREIRLDVAGRVADFKGASGSPILCDQGHAMGMLTAVSHRGPVHSALFVKPWDSVPR
 DAQTVTDV GAPPVAVPGKGYEERSLFLPTGTGKSTLVPANYAKSGHKT LVLNPSVATVA
 AMGPYMKDKMGITPSIFAGHGPTAISRNTGSNLVYATYGRFLAKHKQLLDGVSVILCDE
 CHSSDPTVLLGIGLVRSEAKKAGVNLVLFGTATPPGYATVPHKNI TEAPVGTGDGDI PFY
 GFYLKSTNYTTGRHLI FVHSKSEAERVASALTAKGVKAMFHYSGRDPTAIPTTGS LTVV
 ATDALNTGYTGDFDVTDCNVAVQEEVTV DLEPTFTI SLRTRPATADLRAQRRCGRG

RPLYRYCIASSPPCGTVPSGAVWAAFDAALTWYDIQPAAAARLIGLFAECPYTGHIGV
 NLQDPQRVYEVLPALFALTPDVVRARNAGVSWPLLVGVRSECKRCASGPPSNAPHWQGL
 VGDCAVPLLYALETQRPVIRSPPLVDQLAAALGDSVTETSSGPILLAGLALAAAAIA
 DYTGTLVVVGTFDVRPGGAPRPPQSRDLPGGLSSGQPQSDGEGPPPPRRTDQLTDSOTL
 DALQDVMQTQSWECLDYCYRVATGTLAPRTADALESGARWLREACCGTNPPTSPPFPGGW
 GVTQPLPLGHLAVKAWQTLNLLGTAISLVTAAWAAGSSPPLACIASALLGLQSAFLD
 VRLPAALLAGAGGTLFGDAATGLGMAASFMLGGTVGTAGPFMFLLEVLGGYESTVVGAS
 LAFDLFSGNASMSDLVYLI PALGSPGPAVAGFAVGFVLHLALGKAPSRAWLNRLTLLP
 RSVLPQDFLEEDVRARASELLRSLISRSVSKLLASVGDKYITRTSGSLFWEVAATV
 ISWFRLLLDWVTSCVKDRMPSVVPVMLTCAAYTGPWVGTGTVTGRCGCGAAISADFEE
 GVRVRWHTTSYFCRGYFARGIPLNTLGTTSGPRPAPKLVGHRAIHPVGLTGYVEVLRAE
 TGEVTITRTTEHDLTRDQLLHALRQPPYQVDGVVCSLRYSASLIAMIYSGAVVDYEGR
 AITLPHTVPGDGVNPEYIGTVALEGDAVREAMAEPVWHDTTDRFSDSVEPEELERLTL
 GSEVELPPLDPEGPGVVPSERTFFVASNPQGEVAIERDVETLTPPIPPVPPPLAPLPTRP
 VVLPPPPSDSGPLGTSYDYPATYSDTGSMPPLEGELEGRSGASTPIFWQEPTRFSHVPTS
 SIESTDRSIAQGLLDSVGSAAEALAVATEVVNRSFLTPALCHEALHGSGALVASLPPD
 PEVASVASTPEPDTVHGAVAVAAQALGTVAALTAATGNSSGEASPVLPPEQVRVHHL
 TAPCFNHDGDVLCSTADITLAGVLVHAGGRFNHRHSFWVNGVRRRGTRVASLCTAVS
 VTVRCNSPSGSSCSQTSLPPAEPAVRSPSPRAPRGVHISWTCCQNRSYRGFYSGNFTIS
 DICDGF AIFPDSHLLFFHGNRVLTLETRVEELEGEQIEIQYTCRHETEPVSRVRSYIW
 YGVPLRVGESRPVPVTRPIGSFMRADATRAYVTQMSEVGNRIEKVTIEQTIALEDQFLM
 DRYNLALARAKNGGPYRGWSYEEAVAKVRPRAAAGHNVKLSVADLKTTPAGRKIVEDTIQ
 SIAGERDEHPFMLTAKSEVFFQDKKTRKPPRLLCYPSLEFRVAEKMILGDPGLVAKAVL
 GDAYGFQYTPQQRVRKLLSLWDEKQIPIAITVDAKCFDSTITAFDVDREAEIYAI AHEK
 PDLVRALHRHYKAGPMVNREGVEVGYRNCRPSGIYTTASNSITCWIKVGAACRKGILR
 NPSFLIHGDDCVIIAERGDEDPTPALRAALLEYGYS DPALHASLDEAESASTFLAECT
 AGYDRRKIYFLSTDFRKVLARATSEYGDPVASACGYTL LYPWHPLTRWVLMQVIGLPP
 LRGASVDEAITCEVAGNRLTFPLKQLPSILVALHGPECLRVVSDSNKTLRETNNALQAL
 RMRGLSWYRKRTIALRLK MIRAGGQWAKLAKALI WPPSAYIPSLEVDTFDATQLLDIMS
 RPYNNLELQIGKPIRRSLTGLFVSRICSFSGSDIPATLAERYALGLVLVGVWALAGYWLL
 FWV

SEQ ID NO.: 4
 AGGGTTCTTCGGGTAAATCC

SEQ ID NO.: 5
 CCCTCGGACTGAATTATAGGC

SEQ ID NO.: 6
 GCTTCCCTTTCGCACTATGG

SEQ ID NO.: 7
 CAAGCCGATGCAACTAAAGC

SEQ ID NO.: 8
 GGCTCTTGGATTCACTTGC

SEQ ID NO.: 9
 CCAGTGACCAGCATAATTCG

SEQ ID NO.: 10
 ATGCCATGGGTATGTTGACC

SEQ ID NO.: 11

CTCCTCGTAGTTGCCTTTGC

SEQ ID NO.: 12

TGGGAGTGTCTGGATTATTGC

SEQ ID NO.: 13

CAAGGTGTCCGAGAGGTAGG

SEQ ID NO.: 14

TGGTACTGGTACCGTCACTGG

SEQ ID NO.: 15

GCGAGGACCTGAAGTAGTGC

SEQ ID NO.: 16

CTCCTGTGCTCCCTGAACC

SEQ ID NO.: 17

AACACCATTGACCCAGAAGC

SEQ ID NO.: 18

CTTCTGCCTACATCCCATCG

SEQ ID NO.: 19

TGCATACCTTTCCGGCTAAGG

SEQ ID NO.: 20

ATGCGGCGGCGTTATTCC

SEQ ID NO.: 21

GCTATCAATCTGTCAATCCTGTCC

SEQ ID NO.: 22

CGGGTAAACGGCGGGAGTAAC

SEQ ID NO.: 23

TAGGTAGGGACAGTGGAATCTCG

SEQ ID NO.: 24

CACCACACCTTCTACAAC

SEQ ID NO.: 25

ATCTGGGTCATCTTCTCG

SEQ ID NO.: 26

GCCATCACCATCTTCCAG

SEQ ID NO.: 27

GACTCCACAACATATTCAGC

SEQ ID NO.: 28

AGGGTTCTTCGGGTAAATCCCGGCGCGGTGTTTTGGGTTTCAGGGCAGTAGGGGCAGACG
GGCCAGCAGTCGCTGGTTCCTGGTACCACCACCCTATCCGGACGACCTCCCTCACGAAA
GGTCGCCACGGTCTGTGGCTCGACGACGCCTATAATTCAGTCCGAGGG

SEQ ID NO.: 29

GCTTTCCTTTGCACTATGGTCAGAAATCTACTGTTGCTTTGGCTACTAAAATGGTCTT
GACTGCTAAATTACAACCCTTGTGGAGGAATCTTAACACTACCATTATGTGCTCAGTTA
TTCGGACTTCTGTCCATTGCTTTAGTTGCATCGGCTTG

SEQ ID NO.: 30

GGCTCTTTGGATTCACTTGCAGGGGGGGGGTCTTTGGATCCCCACTCCGATACCTGGCT
GCAAAAATAAGAATGAAGCCATCCACAACACTACACACTGTGTCCAGGCTCTTGGTCAC
GCCATTAGCGTGGTTGGTGAGGCGAGTGCGAATTATGCTGGTCACTGG

SEQ ID NO.: 31

ATGCCATGGGTATGTTGACCGGGTGTTCGCATCGGGGGCCGGAAGTACACTCGGCCCTC
TTTGTCAAGCCGTGGGACAGCGTTCCAGGGATGCCCAAACGGTTACGGACGTGGGTGC
ACCTCTGCGGTACCTGGCAAAGGCAACTACGAGGAG

SEQ ID NO.: 32

TGGGAGTGTCTGGATTATTGCTACCGGGTAGCGACCGGTACCCTGGCTCCTAGAACCGC
CGACGCGCTGGAAAGCGGGGCGCGTTGGCTTCGGGAGGCGTGCTGTGGGACTAACCTC
CCACTAGTCCATTCCCAGGTGGGTGGGGGGTCAACCAACCCCTACCTCTCGGACACCTT
G

SEQ ID NO.: 33

TGGTACTGGTACCGTCACTGGCCGTTGCGGCTGTGGCGCTGCCATCTCTGCTGACTTCG
AGGAGGGTGTTCGCGTTCGCTGGCACACTACTTCATATTTCTGCCGTGGGTACTTTGCC
CGCGGCATTCTCTGAATACTCTTGGCACTACTTCAGGTCCTCGC

SEQ ID NO.: 34

CTCCTGTGCTCCCTGAACCCAGGTGCGGGTGTGCACTTGACTGCTCCTTGTTTCAAT
CATGATGGGGATGTTCTTTGTACTTCGGCTGACATCACCTTGGCCGGAGTTTTGGTGCA
TGCCGGGGGGCGTTTTAACCACCGGCACAGCTTCTGGGTCAATGGTGTT

SEQ ID NO.: 35

CTTCTGCCTACATCCCATCGTTGGAGGTTGACACCTTCGACGCAACCCAGCTTTTGGAC
ATTATGAGCAGGCCCTATAACAACCTTGAGCTCCAGATTGGCAAGCCGATTCGTCCGGTC
GCTGACTGGACTCTTTGTGTCTAGGATCTGTTCTTTTTTTGGTCTGACATTCCTGCTA
CCTTAGCCGAAAGGTATGCA

SEQ ID NO.: 36

CGTAAGGGCGCGTAGTGG

SEQ ID NO.: 37

CCGAAGCATCAAGGAACC

SEQ ID NO.: 38

ACACATTGCAAGGTCTGTCCG

SEQ ID NO.: 39

ACACATTGCAAGGTCTGTCCG

SEQ ID NO.: 40

AACACCGCCAATTACAGAGC

SEQ ID NO.: 41

AACCGAGAGTAGCACCAAGC

SEQ ID NO.: 42

CAAATCCTGATCTGGGAAGG

SEQ ID NO.: 43

CCCAAGGATAAGGACATTGC

SEQ ID NO.: 44

TTGTGATGAGTGCCACAGC

SEQ ID NO.: 45

GCGAAGAGAAATGGTGAAGG

SEQ ID NO.: 46

GTTCTGAACCCGTCTGTTGC

SEQ ID NO.: 47

CAGCAACTGCTTATGCTTGG

SEQ ID NO.: 48

ACCCAAGTTGTTGAGCAAGG

SEQ ID NO.: 49

TACTGACCTTGGGTTGG

SEQ ID NO.: 50

CACCAGAACCGTAAATCATGG

SEQ ID NO.: 51

GAGCAGTCAAGTGACAACC

SEQ ID NO.: 52

TTGCCATCTTCCAGACTCC

SEQ ID NO.: 53

ATAAGACCAGCCCCGATACG

SEQ ID NO.: 54

GTCAACCGTGATAGCAATGG

SEQ ID NO.: 55

ACTCCCCCTGTTAACCTTGC

SEQ ID NO.: 56

GCTCTTCCGATCTNNNNNN

SEQ ID NO.: 57

GCTCTTCCGATCT

SEQ ID NO.: 58

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT

SEQ ID NO.: 59

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATNNNNNNNGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC
CGATCT

SEQ ID NO.: 60

AATGATACGGCGACCACC

SEQ ID NO.: 61

CAAGCAGAAGACGGCATAAC

SEQ ID NO.: 62

AATGATACGGCGACCACCGAGAT

SEQ ID NO.: 63

CAAGCAGAAGACGGCATAACGA

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Novartis Animal Health US, Inc. Cornell University
- <120> Virus, composiciones y procedimientos
- <130> PAT055374-WO-PCT
- 10 <150> US 61/721.858
- <151> 02-11-2012
- <160> 63
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 10479
- <212> ADN
- 20 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler
- <400> 1

ES 2 642 879 T3

tgataccgtg tcccggtagc acctcgcgcg tcccgaagct cgcctgagg ggggagcgtg	60
agggcgcgta gtgggtagc ccccaaac gagccacct agtgagtgc ttagaatgg	120
ttagggagac taccgccttc gctgtttggg gacctaatga tccgcgtgcc agggttcttc	180
gggtaaatcc cggcgcggtg ttttgggttc agggcagtag gggcagacgg gccagcagtc	240
gctggttctt ggtaccacca ccctatccgg acgacctccc tcacgaaagg tcgccacggt	300
ctgtggtcgc acgacgccta taattcagtc cgaggggcgc agccctcgtt aaacttaggc	360
aaggttcttc gccattgatt tggccagggg ttttaagtga cgcgcacctt ttaatgttta	420
atagggttct tcccggcgg gttgacaaac acttccctgg gctcttcgtt ggcctcggtt	480
ccttgatgct tcggcaccca tgagcgcaca ggggggggac cctgcgacag tccgccaaga	540
ggaaaatcct tcgggtgacc tcgtgcgcaa cccaatccct tcttcttcca catggcgtgt	600
ctgtggtgca tgctgtgatg gcgcctttct tgttctgtgt tcttttctgc ggggcggtg	660
ctatccgcgc ccccgctca cacaaatggt ccttcaaagg ccggttttat ctgtcaaact	720
gctgtgatcc aaaggacata ctgctctgca cttacgactt ctgcgttacc cgcgttggtt	780
gtcatgtgtg cacagaagtt tgttgaacg tctctcgtcc tggcatttct gttcgacccg	840
gttcaggtga tgtggagccc gaccttaagg gtttcttctc ggtcgtcgcg gtgggtggct	900
atgctgcctc cctcatcggc ctccgagagc ctttttctgt cggcttgctt ggcctcacca	960
tcctttaccg ggttgatact ggggttcttg acgggttgcg ttgcgacaga ccttgcaatg	1020
tgtcagttcc cgtttgccc tcgtccctcg aggggatgcg ggtcttctgg gaagttgtct	1080
ggggttctgt gtaccgcatt ccgcacatga tttgggcagc ctttaacatc ttcgatgtgt	1140
ggttgttggg tctagtcatc ctcttacc tggagggtcg ctggcacctg gcgatcatgc	1200
tcgtccttgc cgtcggcttg tctacttcta gtgctgaact tgttggggag ccatgggact	1260

ES 2 642 879 T3

catgcacctg taagggtggt gtgggtctta ggcaccttaa cgagactact totccatgtc 1320
 tctgtgaaaa tggcccttgg tactatgatg ctggtacgcc aggcctcacc tctttcgaga 1380
 ggggggggtg ctactgtcct tcccgatcgg tccgcaggtc cggatgctcg ctgtggtgcc 1440
 agtggggatc gtgggttact atctaccctc cctcctggcc taacggccgg cattcttggc 1500
 tctgtaattg gcggtggtg tgcaatggtc gcogatgctg gattacctgc ctogttgaog 1560
 cacgtcgaca ttggtgtggt tcttgcgtcc gcgattggtg ggctgagacc gctgatgatt 1620
 ctcttacctt cgggaactgt ggcactggcc ctocgctcac tgctaactta accgctttcc 1680
 ctttgacta tggtcagaaa tctactgttg ctttggctac taaaatggtc ttgactgcta 1740
 aattacaacc cttgtggagg aatcttaaca ctaccattat gtgctcagtt attcggactt 1800
 ctgtccattg ctttagttgc atcggcttgc cgtcgcctcc cgcggggttg tgggagcgtg 1860
 tcccgggcca acccatttct gattgtgaag gcgtgcaggt ttccactggt aagcggactc 1920
 ccacatgcc aaccaagcag aggtggaatg ctactgtgca cgtctgcccc ggttacgcct 1980
 tctactctcc cgcgtatgat gatggcgagc ttcattgttc tggctactgg cagtggcttt 2040
 tggccggagc cactattcac ttttggtttc ttgtagattt cctgcttgtt taactgttct 2100
 tgatgcacct ctctggtgcg cgcacacccc ccttttttagc cttggctctt tggattcact 2160
 tgcggggggg ggtctttgga tccccactc cgatacctgg ctgcaaaaat aagaatgaag 2220
 ccatccacaa ctacacacac tgtgtccagg ctcttggta cgcatttagc gtggttgggtg 2280
 aggcgagtgc gaattatgct ggtcactggc tgctacaggg cccgtttacc ggtctctcgt 2340
 ggatagtcaa cgcacgtcg tccgcattca atatcacctc ccatgccttg accactgtcg 2400
 gctctacact gtcacactg gctgaggctt ggattccctt gggcggggcc tcacatcccc 2460
 tcgctccttc cacaggcagt ttagcggcgg cgatcctagc gccgtgcgcc tcttgtgctc 2520
 ctgccgcttg gtttagcgca gctcccatgc taggctgggc gtttcgctat cccacttggc 2580
 acgagtccat tatggctctg cttttggtcc tgatttacat gaggttcgcc ggggtcgcctc 2640
 ggcttgccgc tctggttact tgggaagtga ctgcacaact cggcgcgtgt ggtgtgctcg 2700
 tcctcctagt gcttgcgcgt aggaagacca gtgctttggg gtacgagatc tgtatttccc 2760
 ttacgggcca ggctgattgg gactggttgg attttctc ctggctcctc tcgcttctgt 2820
 tcgcttgggc agtgcttct ctccgctccc ttacaccagc aatgaagaag cgtaagctcc 2880
 gatggtactc tcgctgggct tgggtctact ctoggttcat ctcgtgggtc gaccacactc 2940
 cattcaacgg tgtagatccc ctttctcgga aggccttcta ctactggctg tttgcgggtc 3000
 tggtttggcc taacgaggtt gccgttgtgg ttgcctcgta cgtcttgatt gccgtcgtgg 3060
 ttgacttgac tgacatttta ctagagaccc tcttgttgtc aaatcctgat ctgggaaggc 3120

ES 2 642 879 T3

tcgcggtggt gtgtgacacc atcgcgggtc tcaggtctcc ctggttcctc cattgggttc 3180
 tggagcgcgc agctaggcgt ggcatttacc tctatcacca ccaggggcat ttgtccgcac 3240
 ggctcgcaca gtatctcagg gagttggatg gtgccttga gccggcgcgg gttacgccgc 3300
 aggactgcga gtttgtgcgc gacgctcagc ggattcttga gtgtggccgc aattatcgcg 3360
 ggaagggcgt tgttgcccgc aacggtgaca ctgtcatcat tggcgccggt cgcggggcct 3420
 gggagctccc ccccggttc gtgcttacgg ccccccctcat gcttcgaage gttggccgtg 3480
 gagtctggca gacgctagtg acgagcatga tggggaagga caaggaagat cacacaggca 3540
 atgtccttat ccttgggacc gctgccacc ggtcaatggg gacgtgcgtc gggggggtgg 3600
 ttacaccac attccactcc tccaacggtc ggactttggc tgggccaact gggcccctaa 3660
 atcctcggtg gtggtcgccc tcggacgaca ccgccgtgta cccaatgcct gtaggctgca 3720
 gaagtctaga gatttgtgga tgtggagccc ggagcgcgat ggtactgcgc aaggatggtg 3780
 ctctagtcca cggtgaactg tttcctggac gtgagattag actggatgtc gctggtcgtg 3840
 ttgcagactt taagggcgca tcaggttcac ccatactctg tgaccagggt catgccatgg 3900
 gtatgttgac cgcggtgtcg catcgggggc cggaagtaca ctcgccctc tttgtcaagc 3960
 cgtgggacag cgttcccagg gatgccaaa cggttacgga cgtgggtgca cctcctcggg 4020
 tacctggcaa aggcaactac gaggagcgat ccttgttctt gccactggc actggcaagt 4080
 ccacccttgt ccctgccaat tatgccaat caggccacaa gacctgggt ctgaaccctg 4140
 ctgttgccac tgttgccgcc atgggtcctt acatgaagga caaatgggc attacaccgt 4200
 ccatctttgc tggccatggg cccaccgcta tctcgcgcaa cactgggtct aacctggtg 4260
 acgcgactta cggtcgtttc ttggccaagc ataagcagtt gctggacggg gtctctgtta 4320
 ttctttgtga tgagtgccac agctcagacc cgacagtatt gttgggtatt gggctggtgc 4380
 gctctgaagc gaagaaggcc ggagtgaact tagttctctt cggtagcagct acaccacctg 4440
 gctatgctac agtccctcat aagaacatca cggaggcacc ggttgggacg gatggtgaca 4500
 ttccattcta tggtttctac ttgaagtcca ctaactacac cactggcaga catctgatct 4560
 ttgtccactc taagagtgag gcgagcgcg tcgcctccgc tcttactgct aagggcgtca 4620
 aagctatggt ccaactactca ggtcgggatc caaccgcaat cccaccact ggtagtttga 4680
 ccgtagtagc caccgatgcc cttaacacag gatacacagg tgactttgat acggtgacgg 4740
 actgcaatgt ggctgtgcag gaagaagtta ccggtgatct tgaacctacc ttcaccattt 4800
 ctcttgcac tcggccagct acggctgatc tgcgtgccca gaggaggggg cgttgccggtc 4860
 gcggcaggcc tggcctgtac cgttactgta tagcctcttc cccgccttgt ggcacgggcc 4920
 catccggggc cgtttgggcc gcttttgacg ctgcgctgac ttggtacgat attcagccc 4980
 ccgccgctgc gcggttgatt ggactttttg cagagtgcc ttacaccggg cacattggcg 5040

ES 2 642 879 T3

taaacttgca ggacccccag cgggtctatg aggtcctcgc tccgtttgcg ctgacgccag 5100
 acgtagtgag agcaaggaac gccggggtca gctggcccct cctcgttggga gtccaacggt 5160
 cagagtgcaa gcgctgcgcc tcaggtcctc cttccaacgc cccccactgg caggggtttgg 5220
 tcggcgattg tgccgttccg ctgctttacg ccttggagac tcagaggccc gagagggtaa 5280
 tccgatctcc attggtcgat caattggctg cggccttggg cgactctggt acagagacgt 5340
 cctctggccc catccttttg gccggcttgg cgttggctgc ggccgctgct attgctgact 5400
 acaccgggac tttggtggtc gttgggacct ttgacgtgcg ccctgggggg gctccgcggc 5460
 ctccccaatc gcgcgatctg cccggcggat tatcatcagg acagccacag agtgatggcg 5520
 aggggcctcc ccctccccgt cgcactgacc agctgacaga ctcccaaact ttggacgcac 5580
 tccaggatgt gatgaccag acatcgtggg agtgtctgga ttattgctac cgggtagcga 5640
 ccggtaccct ggctcctaga accgccgacg cgctggaaag cggggcgcgt tggcttcggg 5700
 aggcgtgctg tgggactaac cctcccacta gtccattccc aggtgggtgg ggggtcacc 5760
 aaccctacc tctcggacac cttgctgtga aggcttggca aaccttgctc aacaacttg 5820
 gtactgctat ttccctggtc accgcggcct gggccgctgg tagttctcct ccgcttgctt 5880
 gtatcgcctc agcgttgctt ggggtgcaa gcgcgcttgc gctcgcgctg cgcctcccgg 5940
 ccgctctcct tgctgggtcc ggtggcactc tcttcggaga tgccgccact ggcttgggga 6000
 tggccgcgtc gttcatggtg ggtggcacgg ttggaaccgc tggcccttc atgttctac 6060
 ttgaagtctt gggggggtat gagtgcgacg tggctggcgc ctcccttga tttgacctt 6120
 tttctgaaa cgcttctatg tcagacttgg ttacctaact ccctgctctc ggctcacctg 6180
 ggccgcgagt cgctggcttt gccgttggct ttgtctcca cttggctctc ggtaaggctc 6240
 cgtctcgggc ctggtgaac cgaactctta ctctttacc tcgctcggtc gctttacctc 6300
 aggacttctt tttgaggag gacgtgagg ctcgagcttc tgagctcctg cgttccctt 6360
 ctattagtcg ttctgtgtct aagctcctgg cttctgttgg tgacaagtac atcactcgt 6420
 cctctggcag cctcttctgg gaggtgcgag ccactgtgat ctctgggtt aggcgcctgt 6480
 tggactgggt cacctcctgc gtgaaggacc ggatgccctc tggtcctgtg cctatgttga 6540
 cctgccaggc cgcttacct ggaccttggg ttgttactgg taccgtcaact ggccgttgcg 6600
 gctgtggcgc tgccatctct gctgacttcc aggagggtgt tcgcgttcgc tggcacacta 6660
 cttcatattt ctgcggtggg tactttgcc gccgcattcc tctgaatact cttggcacta 6720
 cttcaggctc tcgccggcc cccaagctcg tgggtcacc ggctatccat cccgtggggc 6780
 ttactggcta cgttgggtt ttgcgcgcg aactgggtga ggtaacaatc actaggacta 6840
 ccgagcatga tctcactcgt gaccaacttc tccacgcctt acgccagccg ccctaccagg 6900

ES 2 642 879 T3

tggatggtgt ggtctgttct ctccgtatt cggcttcaact cattgccatg atttacggtt 6960
 ctggtgocgt tgttgattac gaaggtcggg ccattaccct ccctcacacc gtccccggag 7020
 atggcgtcaa tcccagat atcgggacgg tcgcctcga aggggatget gtccgggagg 7080
 ctatggctga accagaggtt tggcatgaca ccactgaccg tttttctgac agtgttgagc 7140
 cggaaagact tgagcgttg actctcggct ccgaggttga gttgcctccg ttggatccgg 7200
 agggaccagg ggtcgttccg tctgagcgtc ccttctttgt ggcttccaat ccgcaagggtg 7260
 aggtcgccat cgagagggac gttgagacgc ttactcccc tattcctcct gttccccctg 7320
 tggctccttt gccacagagg ccggtgttct tgcctccacc tccttctgat tctggccctt 7380
 tgggtacatc cgactaccca gctacctact ctgacaccgg ctctatgccg ccgttggagg 7440
 gtgagctccg tggttcgggt gcatccactc ctatcttctg gcaggaacct actcgtttct 7500
 cccatgtgcc tacatctatt agcattgagt ctactgacag gtctatcgtc caggggttgc 7560
 tcgactccgt cggttcttct gctgagcat tggccgttgc tactgaagtt gttaatcgca 7620
 gctttctcac acctgctctt tgccatgaag cgctccatgg ttctggcgc ttggtggctt 7680
 cactcccgc gccgacccc gaggttgctt cggctccttc cacaccgag cctgacactg 7740
 ttcatggcgc ggttgccgtg gcggcccaga cggcgttggg gactgttgcg gcggccttga 7800
 cggctgccac tggcaatagt tccggggagg ctctcctgt gctccctgaa cccaggtgc 7860
 gggttgtgca cttgactgct ccttgtttca atcatgatgg ggatgttctt tgtacttcgg 7920
 ctgacatcac cttggccgga gttttggtgc atgccgggg gcgttttaac caccggcaca 7980
 gcttctgggt caatggtgtt aggcgcaggg gcaccactcg cgtggcgtcc ctgtgtgaca 8040
 ctgctgtctc agttactggt aggtgcaatt ctccctcggg ctcttcttgc agccaaacat 8100
 cacttctec tgctgaacct gctgtgcgga gccctagccc tagggcccc cgcgcgctgc 8160
 acatcagttg gacttctgc caaaatcgtt cctaccgtgg tttttactca ggaaacttta 8220
 ccatttctga catttctgat gggtttgcca tctttccaga ctctcccac ctcttcttcc 8280
 atgggaaccg ggtgttgaca ctcgagactc gtgttgagga actggagggg gaacagattg 8340
 agattcagta cacctgcaga catgagaccg aaccctctc tcgctcgtg aggtcgtaca 8400
 tttggtacgg tgttccgcta cgggtcgggt agagccgcc tgtaccggtc acccgccaa 8460
 ttggatcctt catgcgcgog gacgtactc gtgcttacgt cacgcagatg tctgaagttg 8520
 ggaaccgtat tgagaaagtc accattgagc agacgattgc cttggaggat cagttcctta 8580
 tggatcgcta caactggcc cttgccaggg ctaagaatgg cggctcgtat cggggctggt 8640
 cttatgaaga ggctgtggcc aaggttcgcc ctccggctgc cgctggccat aacgtcaagc 8700
 tctctgttgc cgatctcaa acgcctcgg gtcggaaaat cgtggaggac accatccagt 8760
 ctattgctgg tgagcgtgat gaacatcctt tcatgcttac agctaagtct gaggtgtttt 8820

ES 2 642 879 T3

tccaagataa gaagactcgc aagccacctc ggetgctctg ttaccctca ttggagtta 8880
gagtggctga gaaaatgatc ctaggcgacc ctggcttggg agccaaggcc gtcctgggtg 8940
atgcatatgg tttccagtac acccccacaac aacggggttag aaaactactc tctctctggg 9000
atgagaagca aataccatt gctatcacgg ttgacgcaa gtgctttgat tccaccatca 9060
cggcgtttga tgtcgaccga gaagctgaaa tctatgccat tgcccatgag aaaccagatc 9120
tggttcgctc tctccatcgg cactataagg caggctctat ggtgaaccgt gaggcggtg 9180
aggttggtta ccgtaactgc cggccatctg gcatttacac cacttctgct tctaattcca 9240
ttacttgctg gatcaagggt ggtgcgcct gtcgtaagat aggccttagg aatccttct 9300
tctcatcca cggatgatgac tgtgtcatta tcgcgagag gggagacgag gaccctacac 9360
ctgctttgctg tgcagctttg ctggaatatg ggtatgactc agatcctgca ctccacgctt 9420
cgctggacga ggcggagtca gcttccactt tcttgctga gtgcacggcg gggtacgacc 9480
gccgtaagat ttatttctt tccactgact tccggaagggt acttgcgagg gctacgtctg 9540
agtacggaga cccggtcgt tctgctgtg gttacacctt gctctatccg tggcaccctt 9600
tgactaggtg ggtcctaag ggcgaggtca ttggactccc ctttttaagg ggtgcctcgg 9660
tggacgaggc aatcacgtgc gaggtggctg gtaaccgtct cacgtttctt ctcaagcagc 9720
tgccatccat cctggtggcc ctgcatggcc cggagtgctt ggcgctcgtc tctgactcca 9780
ataagaccct caggagaca aacaatgcgc ttcaggccct cagaatgcgg gggcttctt 9840
ggtaccgga gaggactatt gctctcaggc ttaaaatgat cagagctggt gggcagtggt 9900
cgaagttgac caagctctc atctggctc cttctgccta catcccatcg ttggaggtg 9960
acaccttca cgcaaccag cttttggaca ttatgagcag gccctataac aacctgagc 10020
tccagattgg caagccgatt cgtcggctgc tgactggact ctttgtgtct aggatctgtt 10080
ctttttttg ttctgacatt cctgctacct tagccgaaag gtatgcactt ggtcttgtt 10140
tggtcgggtg ggctctcgc ggctactggc ttctgttctg ggtgtgagcc cctagtttac 10200
tagcaccctt tacagtttc ctactaaaca tgattgtttg ttagtccaag gcaacaggct 10260
tcggccgggg gagtagcgc ccccccttg tgagctcgt accccctttt ggggctgtc 10320
ctcctggga agaggagcag tacatccccg gctggcagcc gttaattgct acgtggtggt 10380
tatagcccg caaggtaac agggggagta gtgcccccc cgcccccaact cgggtagcgc 10440
gtacgctcgt cggctctcgc acgttaaaga acctggcct 10479

<210> 2
<211> 9567
<212> ADN
<213> virus asociado a la enfermedad de Theiler
<400> 2

ES 2 642 879 T3

atggcgcctt tcttgttgct ggttcctttg tgcggggccg gtgctatccg cgccccgcc 60
tcacacaaat gttccttcaa aggccggttt tatctgtcaa actgctgtga tccaaaggac 120
atactgctct gcacttacga cttctgcggt acccgcggtg gttgtcatgt gtgcacagaa 180
gtttgttgga acgtctctcg tcctggcatt tctgttcgac ccggttcagg tgatgtggag 240
cccacacctt aggggttctt ctcggtcgcct gcgggtgggtg gctatgctgc ctccctcatc 300
ggcctcggag agcctttttc tgtcggcctt cttggcctca ccatccttta ccgggttgat 360
actggggttc ctgacgggtt gcgttgcgac agaccttgca atgtgtcagt tcccgtttgg 420
ccctcgtccc tcgaggggat gcgggtcctt tgggaagtgt tctggggttt gctgtaccgc 480
attccgcaca tgatttgggc agcctttaac atcttcgatg tgtggttgtt ggtctagtc 540
atcctcctta ccctggaggg tcgctggcac ctggcgatca tgctcgtcct tgccgctggc 600
ttgtctaact ctagtgtga acttgttggg gagccatggg actcatgcac ctgtaagggg 660
gttgtgggtc ttaggcacct taacgagact acttctccat gtctctgtga aaatggccct 720
tggtactatg atgctggtac gccaggcctc acctctttcg agaggggggg tggtactgt 780
ccttcccgat cggtcgcgag gtccggatgc tcgctgtggt gccagtgggg atcgtgggtt 840
actatctacc ctccctctg gcctaaccgc cggcattctt ggctctgtaa ttggcgggtg 900
tggtgcaatg gtcgccgatg ctggattacc tgcctcgtt acgcacgtcg acattggtgt 960
ggttcctcgc tcgcgattg ttgggctgag accgctgatg attctcttac cttcgggaac 1020
tgtggcactg gccctcgcgt cactgctaac ttaaccgctt tccctttgca ctatggtcag 1080
aaatctactg ttgctttggc tactaaaatg gtcttgactg ctaaattaca acccttgtgg 1140
aggaatctta aactacat tatgtgctca gttattcggg cttctgtcca ttgctttagt 1200
tgcacgcgct tgccgtgcc tcccgcgggt ttgtgggagc gtgtcccggg cgaaccatt 1260
tctgattgtg aaggcgtgca ggtttccact ggtaagcggg ctcccacatg cccaaccaag 1320
cagaggtgga atgctactgt gcaogtctgc cccggttacg cttctactc tccgcggtat 1380
gatgatggcg agcttcatgt tgctggctac tggcagtggc ttttgccgg acgcactatt 1440
cacttttggg ttctgtaga tttcctgctt gtttactgt tcttgatgca cctctctggt 1500
gcgcgcatca ccccccttt agccttggct ctttgattc acttgcgggg ggggtcttt 1560
ggatcccca ctccgatacc tggtgcaaa aataagaatg aagccatcca caactacaca 1620
cactgtgtcc aggcctcttg tcacgccatt agcgtggtt gtgaggcgag tgcgaattat 1680
gctggtcact ggctgtaca gggcccgtt accggtctct cgtggatagt caacgccacg 1740
tcgtccgat tcaatatcac ctcccatgcc ttgaccactg tcggctctac actgtcatca 1800
ctggtgagg cttggattcc cttgggcggg gcctcacatc ccctcgtcc tccacaggc 1860

ES 2 642 879 T3

agtttagcgg cggcgatcct agcgccgtgc gcctcttggt ctectgcgc ttggttagc 1920
 gcagctccca tgctaggctg ggcgtttcgc tatcccactt ggcacgagtc cattatggct 1980
 ctgcttttgg tcttgattta catgaggctc gccggggctg ctcggttgcc cgcctcgggt 2040
 acttgggaagt tgactcgcaa ctctggcgct gttgggtggt tcgtcctcct agtgcttgcc 2100
 cgtaggaaga ccagtgcttt ggggtacgag atctgtatct cccttacggg cgaggtgat 2160
 tgggactggg tggattttcc ctctggctc ctctcgcttc tgttcgcttg ggcagtgctt 2220
 gctctcggct cccttacacc agcaatgaag aagcgtaagc tccgatggtc ctctcgctgg 2280
 gcttgggtgct actctcgggt catctcgtgg gtcgaccaca ctccattcaa cgggttagat 2340
 cccctttctc ggaaggcttc ctactactgg ctggttgccg gtctggtttg gcctaacgag 2400
 gttgccggtg tggttgcctc gtacgtcttg attgccgtcg tggttgactt gactgacatt 2460
 ttactagaga ccctcttggt gtcaaatcct gatctgggaa ggctcgcggg gttgtgtgac 2520
 accatcggcg gtctcaggtc tccctgggtc ctccattggg ttctggagcg cgcagctagg 2580
 cgtggcattt acctctatca ccaccagggg catttgtccg cacggctcgc acagtatctc 2640
 agggagttgg atggtgcctt ggagccggcg cgggttacgc cgcaggactg cgagtttggt 2700
 cgcgacgctc agcggattct tgagtgtggc cgcaattatc gcgggaaggc ggttgttgcc 2760
 cgcaacggtg aactgtcat cattggcgcc gttcgcgggg cctgggagct ccccccggg 2820
 ttctgtctta cggccccct catgcttcga agcgttggcc gtggagtctg gcagacgcta 2880
 gtgacgagca tgatggggaa ggacaaggaa gatcacacag gcaatgtcct tctcctggg 2940
 accgctgcca cccggccaat ggggacgtgc gtcggggggg tggtttacac cacattccac 3000
 tctccaacg gtcggacttt ggetgggcca actgggccc taaatcctcg gtggtggtcg 3060
 ccctcggagc acaccgccgt gtacccaatg cctgtaggct gcagaagtct agagatttgt 3120
 ggatgtggag cccggagcgc atgggtactg cgcaaggatg gtgctctagt ccacggtgaa 3180
 ctgtttcctg gacgtgagat tagactggat gtcgctggtc gtggtgcaga cttaagggc 3240
 gcatcagggt caccatact ctgtgaccag ggtcatgcca tgggtatggt gaccgcggtg 3300
 tcgcatcggg gcccggaagt aactcggcc ctctttgtca agcctggga cagcgttccc 3360
 agggatgccc aaacggttac ggacgtgggt gcacctcctg cggtaacctg caaaggcaac 3420
 tacgaggagc gatccttggt cttgccact ggcactggca agtccacct tgcacctgcc 3480
 aattatgcca agtcaggcca caagacctg gttctgaacc cgtctgttgc cactgttgcc 3540
 gccatgggtc cttacatgaa ggacaaaatg ggcattacac cgtccatctt tctggtccat 3600
 gggcccaccg ctatctcggc caacactggg tctaacctgg tgtacgcgac ttacggctct 3660
 ttcttgcca agcataagca gttgctggac ggtgtctctg ttattctttg tgatgagtg 3720
 cacagctcag acccgacagt attggtgggt attgggctgg tgcgtctga agcgaagaag 3780

ES 2 642 879 T3

gccggagtga acttagttct cttcggtaga gctacaccac ctggctatgc tacagtccct 3840
 cataagaaca tcacggaggc accggttggg acggatggtg acattccatt ctatggtttc 3900
 tacttgaagt ccaactaacta caccactggc agacatctga tctttgtcca ctctaagagt 3960
 gagggggagc gcgtgcctc cgctcttact gctaagggcg tcaaagctat gttccactac 4020
 tcaggtcggg atccaaccgc aatccccacc actggtagtt tgaccgtagt agccaccgat 4080
 gcccttaaca caggatacac aggtgacttt gatacggtaga cggactgcaa tgtggctgtg 4140
 caggaagaag ttaccgttga tcttgaacct accttcacca tttctcttcg cactcggcca 4200
 gctacggctg atctgcgtgc ccagaggagg gggcgttgcg gtcgcggcag gcctggcctg 4260
 taccgttact gtatagcctc ttccccgcct tgtggcacgg tcccatccgg ggccgtttg 4320
 gccgcttttg acgtgcgct gacttggtag gatattcagc ccgccgccgc tgcgcggtg 4380
 attggacttt ttgcagagtg cccttacacc gggcacattg gcgtaaactt gcaggacccc 4440
 cagcgggtct atgaggtcct cgctcogttt gcgctgacgc cagacgtagt gagagcaagg 4500
 aacgccgggg tcagctggcc cctcctcgtt ggagtccaac ggtcagagtg caagcgtgc 4560
 gcctcaggtc ctcttccaa cgcctccac tggcagggtt tggtcggcga ttgtgccgtt 4620
 ccgctgcttt acgccttga gactcagagg cccgagaggg taatccgatc tccattggtc 4680
 gatcaattgg ctgcggcctt gggcgactct gttacagaga cgtcctctgg ccccatcctt 4740
 ttggccggct tggcgttggc tgcggccgct gctattgctg actacaccgg gactttgggtg 4800
 gtcgttggga cctttgacgt gcgccctggg ggggctccgc ggctcccca atcgcgcgat 4860
 ctgcccggcg gattatcatc aggacagcca cagagtgatg gcgagggggc tccccctcc 4920
 cgtcgcactg accagctgac agactcccaa actttggacg cactccagga tgtgatgacc 4980
 cagacatcgt gggagtgtct ggattattgc taccggtag cgaccgtac cctggctcct 5040
 agaaccgccg acgcgctgga aagcggggcg cgttggcttc gggagggctg ctgtgggact 5100
 aaccctcca ctagtccatt cccaggtggg tggggggtca cccaaccct acctctcga 5160
 caccttgctg tgaaggcttg gcaaaccttg ctcaacaact tgggtactgc tatttcctg 5220
 gtcaccgcgg cctgggccgc tggtagttct cctccgcttg cttgtatcgc ctacagcttg 5280
 cttgggttg c aaagcgcgtt gccgctcagc gtgcgcctcc cggccgctct ccttgctggt 5340
 gccggtggca ctctcttcgg agatgccgcc actggcttgg ggatggccgc gtcgttcatg 5400
 ttgggtggca cggttgaac cgctggccct ttcattgtcc tacttgaagt cttggggggg 5460
 tatgagtcga cgggtgctcg cgcctccctt gcatttgacc tttttctgg aaacgcttct 5520
 atgtcagact tggtttacct aatccctgct ctcggctcac ctgggccgc agtcgctggc 5580
 tttgcccgtg gctttgttct ccacttggct ctcggtaagg ctccgtctcg ggccggttg 5640

ES 2 642 879 T3

aaccgacttc ttactctttt acctcgctcg gtcgctttac ctcaggactt ctttttgag 5700
gaggacgtga gggctcgagc ttctgagctc ctgogttccc tttctattag tcgttctgtg 5760
tctaagctcc tggcttctgt tggtgacaag tacatcactc gtacctctgg cagcctcttc 5820
tgggaggtcg cagccactgt gatctcctgg tttaggcgcc tgttgactg ggtcacctcc 5880
tgcgtgaagg accggatgcc ctctgttccct gtgcctatgt tgacctgcca ggcgcttac 5940
actggacott gggttggtac tggtagcgtc actggcogtt gcggtgtgg cgctgccatc 6000
tctgctgact tcgaggaggg tgttcgogtt cgctggcaca ctacttcata tttctgccgt 6060
gggtactttg cccgoggcac tcctctgaat actcttggca ctacttcagg tcctcgcccg 6120
gcccccaagc tcgtgggtca cgggctatc catcccgtgg ggcttactgg ctacggtgag 6180
gttttgcgcg cggaaactgg tgaggtaaca atcactagga ctaccgagca tgatctcact 6240
cgtgaccaac ttctccagc cttacgccag ccgcctacc aggtggatgg tgtggtctgt 6300
tctctccgct attcggcttc actcattgcc atgatttacg gttctgggtc cgttgttgat 6360
tacgaaggtc gggccattac cctcccac accgtccccg gagatggcgt caatcccag 6420
tatatcgga cggtagccct cgaaggggat gctgtccggg aggctatggc tgaaccagag 6480
gtttggcatg acaccactga ccgtttttct gacagtgttg agccggaaga gcttgagcgc 6540
ttgactctcg gctccgaggt tgagttgcct ccgltggatc cggagggacc aggggtcggt 6600
ccgtctgagc gtaccttctt tgtggcttcc aatccgcaag gtgaggtcgc catcgagagg 6660
gacgttgaga cgcttactcc ccctattcct cctgttccc cgltggctcc tttgccacg 6720
aggccggtgg tcttgcttcc acctcctct gattctggcc ctttgggtac atccgactac 6780
ccagctacct actctgacac cggctctatg ccgcogttgg agggtgagct ccgtggttcg 6840
ggtgcatcca ctctatttt ctggcaggaa cctactogtt tctcccatgt gcctacatct 6900
attagcattg agtctactga caggtctatc gctcaggggt tgctcgactc cgctcggtct 6960
tcggctgagg cattggccgt tgctactgaa gttgttaatc gcagcttct cacacctgct 7020
ctttgccatg aagcgtcca tggltctggc gccttgggtg ctactccc gccgccggac 7080
cccaggttg cctcggtcgc tccacaccc gagcctgaca ctgttcatgg cgcggttgcg 7140
gtggcggccc agacggcgtt ggggactgtt gcggcggcct tgacggctgc cactggcaat 7200
agttccgggg aggttctcc tgtgctcct gaaccccagg tgccgggtgt gcacttgact 7260
gctcctgtt tcaatcatga tgggatgtt ctttgtactt cggctgacat caccttggcc 7320
ggagttttg tgcatgccg gggcgttt aaccaccggc acagcttctg ggtcaatggt 7380
gttaggcgca ggggcaccac tcgctggtg tcctgtgtg aactgctgt ctcagttact 7440
gttaggtgca attctccctc gggctctctc tcagccaaa catcacttcc tcctgctgaa 7500
cctgctgtgc ggagccctag ccctagggcc ccgcggggcg tgcacatcag ttggacttgc 7560

ES 2 642 879 T3

tgccaaaatc gttcctaccg tggtttttac tcaggaaact ttaccatttc tgacatttgt 7620
 gatgggtttg ccatctttcc agactcctcc cacctcttct tccatgggaa ccgggtggtg 7680
 aactcagaga ctctgtttga ggaactggag ggagaacaga ttgagattca gtacacctgc 7740
 agacatgaga ccgaaccctg ctctcgtctc gtgaggtcgt acatttggta cgggtttccg 7800
 ctacgggtcg gtgagagccg ccctgtaccg gtcacccgcc caattggatc cttcatgccc 7860
 gcggacgcta ctctgtctta cgtcacgcag atgtctgaag ttgggaaccg tattgagaaa 7920
 gtcaccattg agcagacgat tgccttggag gatcagttcc ttatggatcg ctacaacttg 7980
 gcccttgcca gggctaagaa tggcggctcc tatcggggct ggtcttatga agaggctgtg 8040
 gccaaagttc gccctcgggc tgccgctggc cataacgtca agctctctgt tgccgatctc 8100
 aaaacgcctg cgggtcggaa aatcgtggag gacaccatcc agtctattgc tggtagcgt 8160
 gatgaacatc ctttcatgct tacagctaag tctgaggtgt tttccaaga taagaagact 8220
 cgcaagccac ctccgctgct ctgttaccoc tcattggagt ttagagtggc tgagaaaatg 8280
 atcctaggcg accctggctt ggtagccaag gccgtcctgg gtgatgcata tggtttccag 8340
 tacaccccc aacaacgggt tagaaaacta ctctctctct gggatgagaa gcaaatacc 8400
 attgctatca cggttgacgc caagtctttt gattccaaca tcacggcgtt tgatgtcgac 8460
 cgagaagctg aatctatgc cattgcccac gagaaaccag atctggttcg cgtctccat 8520
 cggcactata aggcaggtcc tatggtgaac cgtgagggcg ttgaggttgg ttaccgtaac 8580
 tgccgcccat ctggcattta caccacttct gcttctaatt ccattacttg ctggatcaag 8640
 gtgggtgccg cctgtcgtaa gataggcctt aggaatcctt ccttctcat ccacgggtgat 8700
 gactgtgtca ttatcgcgga gaggggagac gaggacccta cacctgcttt gcgtgcagct 8760
 ttgctggaat atgggtatga ctcagatcct gcactccacg cttcgtctga cgaggcggag 8820
 tcagcttcca ctttcttggc tgagtgcacg gcgggttacg accgccgtaa gatttatttc 8880
 ctttccactg acttccggaa ggtacttgcg agggctacgt ctgagtacgg agaccggctc 8940
 gcttctgcgt gtggttacac cttgctctat ccgtggcacc ctttgactag gtgggtccta 9000
 atggcgcagg tcattggact ccccttttta aggggtgctt cggtggaaga ggcaatcacg 9060
 tgcgaggtgg ctggtaaccc tctcacgttt cctctcaagc agctgccatc catcctggtg 9120
 gccctgcatg gcccgagtg cttgcgcgtc gtctctgact ccaataagac cctcagggag 9180
 acaacaatg cgcttcaggc cctcagaatg cgggggcttt cctggtaccg gaagaggact 9240
 attgctctca ggcttaaaat gatcagagct ggtgggcagt gggcgaagtt ggccaaggct 9300
 ctcatctggc ctctctctgc ctacatccca tcgttggagg ttgacacctt cgacgcaacc 9360
 cagcttttgg acattatgag caggccctat aacaaccttg agctccagat tggcaagccg 9420

ES 2 642 879 T3

```
attogtcggt cgctgactgg actctttgtg tctaggatct gttctttttt tggttctgac 9480
attcctgcta ccttagccga aaggtatgca cttggtcttg ttttggtcgg ttgggctctc 9540
gccggctact ggcttctggt ctgggtg 9567
```

5

```
<210> 3
<211> 3189
<212> PRT
<213> virus asociado a la enfermedad de Theiler
<400> 3
```


ES 2 642 879 T3

Met Ala Pro Phe Leu Leu Leu Val Leu Leu Cys Gly Ala Gly Ala Ile
 1 5 10 15

Arg Ala Pro Ala Ser His Lys Cys Ser Phe Lys Gly Arg Phe Tyr Leu
 20 25 30

Ser Asn Cys Cys Asp Pro Lys Asp Ile Leu Leu Cys Thr Tyr Asp Phe
 35 40 45

Cys Val Thr Arg Val Gly Cys His Val Cys Thr Glu Val Cys Trp Asn
 50 55 60

Val Ser Arg Pro Gly Ile Ser Val Arg Pro Gly Ser Gly Asp Val Glu
 65 70 75 80

Pro Asp Leu Lys Gly Phe Phe Ser Val Ala Ala Val Gly Gly Tyr Ala
 85 90 95

Ala Ser Leu Ile Gly Leu Gly Glu Pro Phe Ser Val Gly Leu Leu Gly
 100 105 110

Leu Thr Ile Leu Tyr Arg Val Asp Thr Gly Val Pro Asp Gly Leu Arg
 115 120 125

Cys Asp Arg Pro Cys Asn Val Ser Val Pro Val Trp Pro Ser Ser Leu
 130 135 140

Glu Gly Met Arg Val Leu Trp Glu Val Val Trp Gly Leu Leu Tyr Arg
 145 150 155 160

Ile Pro His Met Ile Trp Ala Ala Phe Asn Ile Phe Asp Val Trp Leu
 165 170 175

Leu Gly Leu Val Ile Leu Leu Thr Leu Glu Gly Arg Trp His Leu Ala
 180 185 190

Ile Met Leu Val Leu Ala Ala Gly Leu Ser Thr Ser Ser Ala Glu Leu

ES 2 642 879 T3

	195					200					205				
Val	Gly	Glu	Pro	Trp	Asp	Ser	Cys	Thr	Cys	Lys	Gly	Val	Val	Gly	Leu
	210					215					220				
Arg	His	Leu	Asn	Glu	Thr	Thr	Ser	Pro	Cys	Leu	Cys	Glu	Asn	Gly	Pro
225					230					235					240
Trp	Tyr	Tyr	Asp	Ala	Gly	Thr	Pro	Gly	Leu	Thr	Ser	Phe	Glu	Arg	Gly
				245					250					255	
Gly	Gly	Tyr	Cys	Pro	Ser	Arg	Ser	Val	Arg	Arg	Ser	Gly	Cys	Ser	Leu
			260					265					270		
Trp	Cys	Gln	Trp	Gly	Ser	Trp	Val	Thr	Ile	Tyr	Pro	Pro	Ser	Trp	Pro
		275					280					285			
Asn	Gly	Arg	His	Ser	Trp	Leu	Cys	Asn	Trp	Arg	Cys	Trp	Cys	Asn	Gly
	290					295					300				
Arg	Arg	Cys	Trp	Ile	Thr	Cys	Leu	Val	Asp	Ala	Arg	Arg	His	Trp	Cys
305					310					315					320
Gly	Ser	Cys	Val	Arg	Asp	Cys	Trp	Ala	Glu	Thr	Ala	Asp	Asp	Ser	Leu
				325					330					335	
Thr	Phe	Gly	Asn	Cys	Gly	Thr	Gly	Pro	Arg	Val	Thr	Ala	Asn	Leu	Thr
			340					345					350		
Ala	Phe	Pro	Leu	His	Tyr	Gly	Gln	Lys	Ser	Thr	Val	Ala	Leu	Ala	Thr
		355					360					365			
Lys	Met	Val	Leu	Thr	Ala	Lys	Leu	Gln	Pro	Leu	Trp	Arg	Asn	Leu	Asn
	370					375					380				
Thr	Thr	Ile	Met	Cys	Ser	Val	Ile	Arg	Thr	Ser	Val	His	Cys	Phe	Ser
385					390					395					400
Cys	Ile	Gly	Leu	Pro	Ser	Pro	Pro	Ala	Gly	Leu	Trp	Glu	Arg	Val	Pro
				405					410					415	
Gly	Glu	Pro	Ile	Ser	Asp	Cys	Glu	Gly	Val	Gln	Val	Ser	Thr	Gly	Lys
			420					425					430		
Arg	Thr	Pro	Thr	Cys	Pro	Thr	Lys	Gln	Arg	Trp	Asn	Ala	Thr	Val	His
		435					440					445			

ES 2 642 879 T3

Val Cys Pro Gly Tyr Ala Phe Tyr Ser Pro Ala Tyr Asp Asp Gly Glu
450 455 460

Leu His Val Ala Gly Tyr Trp Gln Trp Leu Leu Ala Gly Arg Thr Ile
465 470 475 480

His Phe Trp Phe Leu Val Asp Phe Leu Leu Val Tyr Leu Phe Leu Met
485 490 495

His Leu Ser Gly Ala Arg Ile Thr Pro Phe Leu Ala Leu Ala Leu Trp
500 505 510

Ile His Leu Arg Gly Gly Val Phe Gly Ser Pro Thr Pro Ile Pro Gly
515 520 525

Cys Lys Asn Lys Asn Glu Ala Ile His Asn Tyr Thr His Cys Val Gln
530 535 540

Ala Leu Gly His Ala Ile Ser Val Val Gly Glu Ala Ser Ala Asn Tyr
545 550 555 560

Ala Gly His Trp Leu Leu Gln Gly Pro Phe Thr Gly Leu Ser Trp Ile
565 570 575

Val Asn Ala Thr Ser Ser Ala Phe Asn Ile Thr Ser His Ala Leu Thr
580 585 590

Thr Val Gly Ser Thr Leu Ser Ser Leu Ala Glu Ala Trp Ile Pro Leu
595 600 605

Gly Gly Ala Ser His Pro Leu Ala Pro Ser Thr Gly Ser Leu Ala Ala
610 615 620

Ala Ile Leu Ala Pro Cys Ala Ser Cys Ala Pro Ala Ala Trp Phe Ser
625 630 635 640

Ala Ala Pro Met Leu Gly Trp Ala Phe Arg Tyr Pro Thr Trp His Glu
645 650 655

Ser Ile Met Ala Leu Leu Leu Val Leu Ile Tyr Met Arg Phe Ala Gly
660 665 670

Val Ala Arg Leu Ala Ala Leu Val Thr Trp Lys Leu Thr Arg Asn Phe
675 680 685

Gly Ala Val Gly Val Leu Val Leu Leu Val Leu Ala Arg Arg Lys Thr
690 695 700

ES 2 642 879 T3

Ser Ala Leu Gly Tyr Glu Ile Cys Ile Ser Leu Thr Gly Glu Ala Asp
705 710 715 720

Trp Asp Trp Leu Asp Phe Ser Ser Trp Leu Leu Ser Leu Leu Phe Ala
725 730 735

Trp Ala Val Leu Ala Leu Ala Ser Leu Thr Pro Ala Met Lys Lys Arg
740 745 750

Lys Leu Arg Trp Tyr Ser Arg Trp Ala Trp Cys Tyr Ser Arg Phe Ile
755 760 765

Ser Trp Val Asp His Thr Pro Phe Asn Gly Val Asp Pro Leu Ser Arg
770 775 780

Lys Ala Ser Tyr Tyr Trp Leu Phe Ala Gly Leu Val Trp Pro Asn Glu
785 790 800

Val Ala Val Val Val Ala Ser Tyr Val Leu Ile Ala Val Val Val Asp
805 810 815

Leu Thr Asp Ile Leu Leu Glu Thr Leu Leu Leu Ser Asn Pro Asp Leu
820 825 830

Gly Arg Leu Ala Val Leu Cys Asp Thr Ile Ala Gly Leu Arg Ser Pro
835 840 845

Trp Phe Leu His Trp Val Leu Glu Arg Ala Ala Arg Arg Gly Ile Tyr
850 855 860

Leu Tyr His His Gln Gly His Leu Ser Ala Arg Leu Ala Gln Tyr Leu
865 870 875 880

Arg Glu Leu Asp Gly Ala Leu Glu Pro Ala Arg Val Thr Pro Gln Asp
885 890 895

Cys Glu Phe Val Arg Asp Ala Gln Arg Ile Leu Glu Cys Gly Arg Asn
900 905 910

Tyr Arg Gly Lys Ala Val Val Ala Arg Asn Gly Asp Thr Val Ile Ile
915 920 925

Gly Ala Val Arg Gly Ala Trp Glu Leu Pro Pro Gly Phe Val Leu Thr
930 935 940

Ala Pro Leu Met Leu Arg Ser Val Gly Arg Gly Val Trp Gln Thr Leu
945 950 955 960

ES 2 642 879 T3

Val Thr Ser Met Met Gly Lys Asp Lys Glu Asp His Thr Gly Asn Val
 965 970 975

Leu Ile Leu Gly Thr Ala Ala Thr Arg Ser Met Gly Thr Cys Val Gly
 980 985 990

Gly Val Val Tyr Thr Thr Phe His Ser Ser Asn Gly Arg Thr Leu Ala
 995 1000 1005

Gly Pro Thr Gly Pro Leu Asn Pro Arg Trp Trp Ser Pro Ser Asp
 1010 1015 1020

Asp Thr Ala Val Tyr Pro Met Pro Val Gly Cys Arg Ser Leu Glu
 1025 1030 1035

Ile Cys Gly Cys Gly Ala Arg Ser Ala Trp Val Leu Arg Lys Asp
 1040 1045 1050

Gly Ala Leu Val His Gly Glu Leu Phe Pro Gly Arg Glu Ile Arg
 1055 1060 1065

Leu Asp Val Ala Gly Arg Val Ala Asp Phe Lys Gly Ala Ser Gly
 1070 1075 1080

Ser Pro Ile Leu Cys Asp Gln Gly His Ala Met Gly Met Leu Thr
 1085 1090 1095

Ala Val Ser His Arg Gly Pro Glu Val His Ser Ala Leu Phe Val
 1100 1105 1110

Lys Pro Trp Asp Ser Val Pro Arg Asp Ala Gln Thr Val Thr Asp
 1115 1120 1125

Val Gly Ala Pro Pro Ala Val Pro Gly Lys Gly Asn Tyr Glu Glu
 1130 1135 1140

Arg Ser Leu Phe Leu Pro Thr Gly Thr Gly Lys Ser Thr Leu Val
 1145 1150 1155

Pro Ala Asn Tyr Ala Lys Ser Gly His Lys Thr Leu Val Leu Asn
 1160 1165 1170

Pro Ser Val Ala Thr Val Ala Ala Met Gly Pro Tyr Met Lys Asp
 1175 1180 1185

Lys Met Gly Ile Thr Pro Ser Ile Phe Ala Gly His Gly Pro Thr

ES 2 642 879 T3

1190							1195								1200
Ala Ile Ser Arg Asn Thr Gly							Ser Asn Leu Val Tyr								Ala Thr Tyr
1205						1210									1215
Gly Arg Phe Leu Ala Lys His							Lys Gln Leu Leu Asp								Gly Val Ser
1220						1225									1230
Val Ile Leu Cys Asp Glu Cys							His Ser Ser Asp								Pro Thr Val Leu
1235						1240									1245
Leu Gly Ile Gly Leu Val Arg							Ser Glu Ala Lys Lys								Ala Gly Val
1250						1255									1260
Asn Leu Val Leu Phe Gly Thr							Ala Thr Pro Pro Gly								Tyr Ala Thr
1265						1270									1275
Val Pro His Lys Asn Ile Thr							Glu Ala Pro Val Gly								Thr Asp Gly
1280						1285									1290
Asp Ile Pro Phe Tyr Gly Phe							Tyr Leu Lys Ser Thr								Asn Tyr Thr
1295						1300									1305
Thr Gly Arg His Leu Ile Phe							Val His Ser Lys Ser								Glu Ala Glu
1310						1315									1320
Arg Val Ala Ser Ala Leu Thr							Ala Lys Gly Val Lys								Ala Met Phe
1325						1330									1335
His Tyr Ser Gly Arg Asp Pro							Thr Ala Ile Pro Thr								Thr Gly Ser
1340						1345									1350
Leu Thr Val Val Ala Thr Asp							Ala Leu Asn Thr Gly								Tyr Thr Gly
1355						1360									1365
Asp Phe Asp Thr Val Thr Asp							Cys Asn Val Ala Val								Gln Glu Glu
1370						1375									1380
Val Thr Val Asp Leu Glu Pro							Thr Phe Thr Ile Ser								Leu Arg Thr
1385						1390									1395
Arg Pro Ala Thr Ala Asp Leu							Arg Ala Gln Arg Arg								Gly Arg Cys
1400						1405									1410
Gly Arg Gly Arg Pro Gly Leu							Tyr Arg Tyr Cys Ile								Ala Ser Ser
1415						1420									1425

ES 2 642 879 T3

Pro Pro Cys Gly Thr Val Pro Ser Gly Ala Val Trp Ala Ala Phe
1430 1435 1440

Asp Ala Ala Leu Thr Trp Tyr Asp Ile Gln Pro Ala Ala Ala Ala
1445 1450 1455

Arg Leu Ile Gly Leu Phe Ala Glu Cys Pro Tyr Thr Gly His Ile
1460 1465 1470

Gly Val Asn Leu Gln Asp Pro Gln Arg Val Tyr Glu Val Leu Ala
1475 1480 1485

Pro Phe Ala Leu Thr Pro Asp Val Val Arg Ala Arg Asn Ala Gly
1490 1495 1500

Val Ser Trp Pro Leu Leu Val Gly Val Gln Arg Ser Glu Cys Lys
1505 1510 1515

Arg Cys Ala Ser Gly Pro Pro Ser Asn Ala Pro His Trp Gln Gly
1520 1525 1530

Leu Val Gly Asp Cys Ala Val Pro Leu Leu Tyr Ala Leu Glu Thr
1535 1540 1545

Gln Arg Pro Glu Arg Val Ile Arg Ser Pro Leu Val Asp Gln Leu
1550 1555 1560

Ala Ala Ala Leu Gly Asp Ser Val Thr Glu Thr Ser Ser Gly Pro
1565 1570 1575

Ile Leu Leu Ala Gly Leu Ala Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ile Ala
1580 1585 1590

Asp Tyr Thr Gly Thr Leu Val Val Val Gly Thr Phe Asp Val Arg
1595 1600 1605

Pro Gly Gly Ala Pro Arg Pro Pro Gln Ser Arg Asp Leu Pro Gly
1610 1615 1620

Gly Leu Ser Ser Gly Gln Pro Gln Ser Asp Gly Glu Gly Pro Pro
1625 1630 1635

Pro Pro Arg Arg Thr Asp Gln Leu Thr Asp Ser Gln Thr Leu Asp
1640 1645 1650

Ala Leu Gln Asp Val Met Thr Gln Thr Ser Trp Glu Cys Leu Asp
1655 1660 1665

ES 2 642 879 T3

Tyr Cys Tyr Arg Val Ala Thr Gly Thr Leu Ala Pro Arg Thr Ala
 1670 1675 1680

Asp Ala Leu Glu Ser Gly Ala Arg Trp Leu Arg Glu Ala Cys Cys
 1685 1690 1695

Gly Thr Asn Pro Pro Thr Ser Pro Phe Pro Gly Gly Trp Gly Val
 1700 1705 1710

Thr Gln Pro Leu Pro Leu Gly His Leu Ala Val Lys Ala Trp Gln
 1715 1720 1725

Thr Leu Leu Asn Asn Leu Gly Thr Ala Ile Ser Leu Val Thr Ala
 1730 1735 1740

Ala Trp Ala Ala Gly Ser Ser Pro Pro Leu Ala Cys Ile Ala Ser
 1745 1750 1755

Ala Leu Leu Gly Leu Gln Ser Ala Leu Pro Leu Asp Val Arg Leu
 1760 1765 1770

Pro Ala Ala Leu Leu Ala Gly Ala Gly Gly Thr Leu Phe Gly Asp
 1775 1780 1785

Ala Ala Thr Gly Leu Gly Met Ala Ala Ser Phe Met Leu Gly Gly
 1790 1795 1800

Thr Val Gly Thr Ala Gly Pro Phe Met Phe Leu Leu Glu Val Leu
 1805 1810 1815

Gly Gly Tyr Glu Ser Thr Val Val Gly Ala Ser Leu Ala Phe Asp
 1820 1825 1830

Leu Phe Ser Gly Asn Ala Ser Met Ser Asp Leu Val Tyr Leu Ile
 1835 1840 1845

Pro Ala Leu Gly Ser Pro Gly Pro Ala Val Ala Gly Phe Ala Val
 1850 1855 1860

Gly Phe Val Leu His Leu Ala Leu Gly Lys Ala Pro Ser Arg Ala
 1865 1870 1875

Trp Leu Asn Arg Leu Leu Thr Leu Leu Pro Arg Ser Val Ala Leu
 1880 1885 1890

Pro Gln Asp Phe Phe Leu Glu Glu Asp Val Arg Ala Arg Ala Ser
 1895 1900 1905

ES 2 642 879 T3

Glu Leu Leu Arg Ser Leu Ser Ile Ser Arg Ser Val Ser Lys Leu
 1910 1915 1920

Leu Ala Ser Val Gly Asp Lys Tyr Ile Thr Arg Thr Ser Gly Ser
 1925 1930 1935

Leu Phe Trp Glu Val Ala Ala Thr Val Ile Ser Trp Phe Arg Arg
 1940 1945 1950

Leu Leu Asp Trp Val Thr Ser Cys Val Lys Asp Arg Met Pro Ser
 1955 1960 1965

Val Pro Val Pro Met Leu Thr Cys Gln Ala Ala Tyr Thr Gly Pro
 1970 1975 1980

Trp Val Gly Thr Gly Thr Val Thr Gly Arg Cys Gly Cys Gly Ala
 1985 1990 1995

Ala Ile Ser Ala Asp Phe Glu Glu Gly Val Arg Val Arg Trp His
 2000 2005 2010

Thr Thr Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Tyr Phe Ala Arg Gly Ile Pro
 2015 2020 2025

Leu Asn Thr Leu Gly Thr Thr Ser Gly Pro Arg Pro Ala Pro Lys
 2030 2035 2040

Leu Val Gly His Arg Ala Ile His Pro Val Gly Leu Thr Gly Tyr
 2045 2050 2055

Val Glu Val Leu Arg Ala Glu Thr Gly Glu Val Thr Ile Thr Arg
 2060 2065 2070

Thr Thr Glu His Asp Leu Thr Arg Asp Gln Leu Leu His Ala Leu
 2075 2080 2085

Arg Gln Pro Pro Tyr Gln Val Asp Gly Val Val Cys Ser Leu Arg
 2090 2095 2100

Tyr Ser Ala Ser Leu Ile Ala Met Ile Tyr Gly Ser Gly Ala Val
 2105 2110 2115

Val Asp Tyr Glu Gly Arg Ala Ile Thr Leu Pro His Thr Val Pro
 2120 2125 2130

Gly Asp Gly Val Asn Pro Glu Tyr Ile Gly Thr Val Ala Leu Glu

ES 2 642 879 T3

2135						2140									2145
Gly	Asp	Ala	Val	Arg	Glu	Ala	Met	Ala	Glu	Pro	Glu	Val	Trp	His	
2150						2155					2160				
Asp	Thr	Thr	Asp	Arg	Phe	Ser	Asp	Ser	Val	Glu	Pro	Glu	Glu	Leu	
2165						2170					2175				
Glu	Arg	Leu	Thr	Leu	Gly	Ser	Glu	Val	Glu	Leu	Pro	Pro	Leu	Asp	
2180						2185					2190				
Pro	Glu	Gly	Pro	Gly	Val	Val	Pro	Ser	Glu	Arg	Thr	Phe	Phe	Val	
2195						2200					2205				
Ala	Ser	Asn	Pro	Gln	Gly	Glu	Val	Ala	Ile	Glu	Arg	Asp	Val	Glu	
2210						2215					2220				
Thr	Leu	Thr	Pro	Pro	Ile	Pro	Pro	Val	Pro	Pro	Leu	Ala	Pro	Leu	
2225						2230					2235				
Pro	Thr	Arg	Pro	Val	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	Asp	Ser	Gly	
2240						2245					2250				
Pro	Leu	Gly	Thr	Ser	Asp	Tyr	Pro	Ala	Thr	Tyr	Ser	Asp	Thr	Gly	
2255						2260					2265				
Ser	Met	Pro	Pro	Leu	Glu	Gly	Glu	Leu	Arg	Gly	Ser	Gly	Ala	Ser	
2270						2275					2280				
Thr	Pro	Ile	Phe	Trp	Gln	Glu	Pro	Thr	Arg	Phe	Ser	His	Val	Pro	
2285						2290					2295				
Thr	Ser	Ile	Ser	Ile	Glu	Ser	Thr	Asp	Arg	Ser	Ile	Ala	Gln	Gly	
2300						2305					2310				
Leu	Leu	Asp	Ser	Val	Gly	Ser	Ser	Ala	Glu	Ala	Leu	Ala	Val	Ala	
2315						2320					2325				
Thr	Glu	Val	Val	Asn	Arg	Ser	Phe	Leu	Thr	Pro	Ala	Leu	Cys	His	
2330						2335					2340				
Glu	Ala	Leu	His	Gly	Ser	Gly	Ala	Leu	Val	Ala	Ser	Leu	Pro	Pro	
2345						2350					2355				
Pro	Asp	Pro	Glu	Val	Ala	Ser	Val	Ala	Ser	Thr	Pro	Glu	Pro	Asp	
2360						2365					2370				

ES 2 642 879 T3

Thr Val His Gly Ala Val Ala Val Ala Ala Gln Thr Ala Leu Gly
 2375 2380 2385

Thr Val Ala Ala Ala Leu Thr Ala Ala Thr Gly Asn Ser Ser Gly
 2390 2395 2400

Glu Ala Ser Pro Val Leu Pro Glu Pro Gln Val Arg Val Val His
 2405 2410 2415

Leu Thr Ala Pro Cys Phe Asn His Asp Gly Asp Val Leu Cys Thr
 2420 2425 2430

Ser Ala Asp Ile Thr Leu Ala Gly Val Leu Val His Ala Gly Gly
 2435 2440 2445

Arg Phe Asn His Arg His Ser Phe Trp Val Asn Gly Val Arg Arg
 2450 2455 2460

Arg Gly Thr Thr Arg Val Ala Ser Leu Cys Asp Thr Ala Val Ser
 2465 2470 2475

Val Thr Val Arg Cys Asn Ser Pro Ser Gly Ser Ser Cys Ser Gln
 2480 2485 2490

Thr Ser Leu Pro Pro Ala Glu Pro Ala Val Arg Ser Pro Ser Pro
 2495 2500 2505

Arg Ala Pro Arg Gly Val His Ile Ser Trp Thr Cys Cys Gln Asn
 2510 2515 2520

Arg Ser Tyr Arg Gly Phe Tyr Ser Gly Asn Phe Thr Ile Ser Asp
 2525 2530 2535

Ile Cys Asp Gly Phe Ala Ile Phe Pro Asp Ser Ser His Leu Phe
 2540 2545 2550

Phe His Gly Asn Arg Val Leu Thr Leu Glu Thr Arg Val Glu Glu
 2555 2560 2565

Leu Glu Gly Glu Gln Ile Glu Ile Gln Tyr Thr Cys Arg His Glu
 2570 2575 2580

Thr Glu Pro Val Ser Arg Cys Val Arg Ser Tyr Ile Trp Tyr Gly
 2585 2590 2595

Val Pro Leu Arg Val Gly Glu Ser Arg Pro Val Pro Val Thr Arg
 2600 2605 2610

ES 2 642 879 T3

Pro Ile Gly Ser Phe Met Arg Ala Asp Ala Thr Arg Ala Tyr Val
 2615 2620 2625

Thr Gln Met Ser Glu Val Gly Asn Arg Ile Glu Lys Val Thr Ile
 2630 2635 2640

Glu Gln Thr Ile Ala Leu Glu Asp Gln Phe Leu Met Asp Arg Tyr
 2645 2650 2655

Asn Leu Ala Leu Ala Arg Ala Lys Asn Gly Gly Pro Tyr Arg Gly
 2660 2665 2670

Trp Ser Tyr Glu Glu Ala Val Ala Lys Val Arg Pro Arg Ala Ala
 2675 2680 2685

Ala Gly His Asn Val Lys Leu Ser Val Ala Asp Leu Lys Thr Pro
 2690 2695 2700

Ala Gly Arg Lys Ile Val Glu Asp Thr Ile Gln Ser Ile Ala Gly
 2705 2710 2715

Glu Arg Asp Glu His Pro Phe Met Leu Thr Ala Lys Ser Glu Val
 2720 2725 2730

Phe Phe Gln Asp Lys Lys Thr Arg Lys Pro Pro Arg Leu Leu Cys
 2735 2740 2745

Tyr Pro Ser Leu Glu Phe Arg Val Ala Glu Lys Met Ile Leu Gly
 2750 2755 2760

Asp Pro Gly Leu Val Ala Lys Ala Val Leu Gly Asp Ala Tyr Gly
 2765 2770 2775

Phe Gln Tyr Thr Pro Gln Gln Arg Val Arg Lys Leu Leu Ser Leu
 2780 2785 2790

Trp Asp Glu Lys Gln Ile Pro Ile Ala Ile Thr Val Asp Ala Lys
 2795 2800 2805

Cys Phe Asp Ser Thr Ile Thr Ala Phe Asp Val Asp Arg Glu Ala
 2810 2815 2820

Glu Ile Tyr Ala Ile Ala His Glu Lys Pro Asp Leu Val Arg Ala
 2825 2830 2835

Leu His Arg His Tyr Lys Ala Gly Pro Met Val Asn Arg Glu Gly
 2840 2845 2850

ES 2 642 879 T3

Val Glu Val Gly Tyr Arg Asn Cys Arg Pro Ser Gly Ile Tyr Thr
 2855 2860 2865

Thr Ser Ala Ser Asn Ser Ile Thr Cys Trp Ile Lys Val Gly Ala
 2870 2875 2880

Ala Cys Arg Lys Ile Gly Leu Arg Asn Pro Ser Phe Leu Ile His
 2885 2890 2895

Gly Asp Asp Cys Val Ile Ile Ala Glu Arg Gly Asp Glu Asp Pro
 2900 2905 2910

Thr Pro Ala Leu Arg Ala Ala Leu Leu Glu Tyr Gly Tyr Asp Ser
 2915 2920 2925

Asp Pro Ala Leu His Ala Ser Leu Asp Glu Ala Glu Ser Ala Ser
 2930 2935 2940

Thr Phe Leu Ala Glu Cys Thr Ala Gly Tyr Asp Arg Arg Lys Ile
 2945 2950 2955

Tyr Phe Leu Ser Thr Asp Phe Arg Lys Val Leu Ala Arg Ala Thr
 2960 2965 2970

Ser Glu Tyr Gly Asp Pro Val Ala Ser Ala Cys Gly Tyr Thr Leu
 2975 2980 2985

Leu Tyr Pro Trp His Pro Leu Thr Arg Trp Val Leu Met Ala Gln
 2990 2995 3000

Val Ile Gly Leu Pro Phe Leu Arg Gly Ala Ser Val Asp Glu Ala
 3005 3010 3015

Ile Thr Cys Glu Val Ala Gly Asn Arg Leu Thr Phe Pro Leu Lys
 3020 3025 3030

Gln Leu Pro Ser Ile Leu Val Ala Leu His Gly Pro Glu Cys Leu
 3035 3040 3045

Arg Val Val Ser Asp Ser Asn Lys Thr Leu Arg Glu Thr Asn Asn
 3050 3055 3060

Ala Leu Gln Ala Leu Arg Met Arg Gly Leu Ser Trp Tyr Arg Lys
 3065 3070 3075

Arg Thr Ile Ala Leu Arg Leu Lys Met Ile Arg Ala Gly Gly Gln

ES 2 642 879 T3

3080						3085						3090			
Trp	Ala	Lys	Leu	Ala	Lys	Ala	Leu	Ile	Trp	Pro	Pro	Ser	Ala	Tyr	
	3095					3100					3105				
Ile	Pro	Ser	Leu	Glu	Val	Asp	Thr	Phe	Asp	Ala	Thr	Gln	Leu	Leu	
	3110					3115					3120				
Asp	Ile	Met	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn	Asn	Leu	Glu	Leu	Gln	Ile	Gly	
	3125					3130					3135				
Lys	Pro	Ile	Arg	Arg	Ser	Leu	Thr	Gly	Leu	Phe	Val	Ser	Arg	Ile	
	3140					3145					3150				
Cys	Ser	Phe	Phe	Gly	Ser	Asp	Ile	Pro	Ala	Thr	Leu	Ala	Glu	Arg	
	3155					3160					3165				
Tyr	Ala	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Val	Gly	Trp	Ala	Leu	Ala	Gly	Tyr	
	3170					3175					3180				
Trp	Leu	Leu	Phe	Trp	Val										
	3185														

5 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

10 <400> 4
 agggttcttc ggtaaatcc 20

15 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

20 <400> 5
 ccctcgact gaattatagg c 21

25 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

30 <400> 6
 gctttccctt tgactatgg 20

35 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

<400> 7
 caagccgatg caactaaagc 20

<210> 8

<211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

5

<400> 8
 ggctcttgg attcactgc 20

<210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

10

<400> 9
 ccagtgacca gcataattcg 20

15

<210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

20

<400> 10
 atgcatggg tatgttgacc 20

25

<210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

30

<400> 11
 ctctcgtag ttgccttgc 20

<210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

35

<400> 12
 tgggagtgtc tggattattg c 21

40

<210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

45

<400> 13
 caaggtgtcc gagaggtagg 20

<210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

50

<400> 14
 tggfactggt accgtcactg g 21

55

<210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

60

<400> 15
 gcgaggacct gaagtagtgc 20

65

<210> 16
 <211> 19
 <212> ADN

<213> virus asociado a la enfermedad de Theiler
 <400> 16
 5 ctcctgtgct ccctgaacc 19
 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler
 10
 <400> 17
 aacaccattg acccagaagc 20
 <210> 18
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler
 20
 <400> 18
 cttctgccta catcccatcg 20
 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler
 <400> 19
 tgcatacctt tcggctaagg 20
 30 <210> 20
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler
 35 <400> 20
 atgcggcggc gttattcc 18
 <210> 21
 <211> 24
 40 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler
 <400> 21
 45 gctatcaatc tgcaatcct gtcc 24
 <210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler
 50 <400> 22
 cgggtaaacg gcgggagtaa c 21
 <210> 23
 55 <211> 24
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler
 <400> 23
 60 taggtaggga cagtgggaat ctcg 24
 <210> 24
 <211> 18
 <212> ADN
 65 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

ES 2 642 879 T3

<400> 24
 caccacacct tctacaac 18

5 <210> 25
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler
 <400> 25
 atctgggtca tcttctcg 18

10 <210> 26
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

15 <400> 26
 gccatcacca tcttccag 18

20 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

25 <400> 27
 gactccacaa catattcagc 20

30 <210> 28
 <211> 166
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

<400> 28
 agggttcttc gggtaaatec cggcgcgggtg ttttgggttc agggcagtag gggcagacgg 60
 gccagcagtc gctggttccct ggtaccacca ccctatccgg acgacctccc tcacgaaagg 120
 tcgccacggg ctgtggctcg acgacgccta taattcagtc cgaggg 166

35 <210> 29
 <211> 156
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

40 <400> 29
 gctttccott tgcactatgg tcagaaatct actggtgctt tggctactaa aatggtcttg 60
 actgctaaat tacaaccctt gtggaggaat cttaacacta ccattatgtg ctcagttatt 120
 cggacttctg tccattgctt tagttgcatc ggcttg 156

45 <210> 30
 <211> 166
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

50 <400> 30

ES 2 642 879 T3

ggctctttgg attcaacttgc ggggggggggt ctttggatcc cccactccga tacctggctg 60
 caaaaataag aatgaagcca tccacaacta cacacactgt gtccaggctc ttggtcacgc 120
 cattagcgtg gttggtgagg cgagtgcgaa ttatgctggt cactgg 166

5 <210> 31
 <211> 155
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler
 <400> 31

atgccatggg tatgttgacc gcggtgtcgc atcggggggcc ggaagtacac tcggccctct 60
 ttgtcaagcc gtgggacagc gttcccaggg atgcccaaac ggttacggac gtgggtgcac 120
 ctctcgcggt acctggcaaa ggcaactacg aggag 155

10 <210> 32
 <211> 178
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler
 <400> 32

tgggagtgtc tggattattg ctaccgggta gcgaccggta ccctggctcc tagaaccgcc 60
 gacgcgctgg aaagcggggc gcgttggctt cgggaggegt gctgtgggac taaccctccc 120
 actagtccat tcccagggtg gtgggggggtc acccaacccc tacctctcgg acaccttg 178

15 <210> 33
 <211> 163
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler
 <400> 33

20 tggtaactggt accgtcactg gccgttgccg ctgtggcgt gccatctctg ctgacttcga 60
 ggaggtggt cgcgttcgt ggcacactac ttcataattc tgccgtgggt actttgcccg 120
 cggcattcct ctgaatactc ttggcactac ttcaggtcct cgc 163

25 <210> 34
 <211> 167
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler
 <400> 34

30 ctctctgtct ccctgaaccc caggtgcggg ttgtgcactt gactgctcct tgtttcaatc 60
 atgatgggga tgttctttgt acttcggctg acatcacctt ggccggagt ttggtgcatg 120
 ccggggggcg ttttaaccac cggcacagct tctgggtcaa tgggtgtt 167

35 <210> 35
 <211> 197

40

ES 2 642 879 T3

<212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

 <400> 35
 5
 cttctgccta catcccatog ttggaggttg acaccttcga cgcaaccag cttttggaca 60
 ttatgagcag gccctataac aaccttgagc tccagattgg caagccgatt cgtcggtcgc 120
 tgactggact ctttgtgtct aggatctgtt ctttttttgg ttctgacatt cctgctacct 180
 tagccgaaag gtatgca 197

 <210> 36
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

 <400> 36
 15
 cgtaagggcg cgtagtgg 18

 <210> 37
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler
 20

 <400> 37
 ccgaagcatc aaggaacc 18

 <210> 38
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler
 25

 <400> 38
 30
 acacattgca aggtctgtcg 20

 <210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler
 35

 <400> 39
 acacattgca aggtctgtcg 20

 <210> 40
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler
 40

 <400> 40
 45
 aacaccgcca attacagagc 20

 <210> 41
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler
 50

 <400> 41
 aaccgagagt agcaccaagc 20
 55

 <210> 42
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

<400> 42
 caaatcctga tctggaagg 20

5 <210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

10 <400> 43
 cccaaggata aggacattgc 20

15 <210> 44
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

20 <400> 44
 tttgtgatga gtgccacagc 20

25 <210> 45
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

30 <400> 45
 gcgaagagaa atggtgaagg 20

35 <210> 46
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

40 <400> 46
 gttctgaacc cgtctgttgc 20

45 <210> 47
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

50 <400> 47
 cagcaactgc ttatgcttgg 20

55 <210> 48
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

60 <400> 48
 acccaagttg ttgagcaagg 20

65 <210> 49
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

70 <400> 49
 tacactggac cttgggttgg 20

75 <210> 50
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler

80 <400> 50
 caccagaacc gtaaactatg g 21

<210> 51
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler
 5
 <400> 51
 gagcagtcaa gtcacaacc 20
 <210> 52
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler
 10
 <400> 52
 ttgccatctt tccagactcc 20
 <210> 53
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler
 15
 <400> 53
 ataagaccag ccccgatagc 20
 <210> 54
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler
 20
 <400> 54
 gtcaaccgtg atagcaatgg 20
 <210> 55
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> virus asociado a la enfermedad de Theiler
 25
 <400> 55
 actccccctg ttaacctgc 20
 <210> 56
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Construcción sintética
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(19)
 <223> el N de las posiciones 14-19 puede ser cualquier nucleótido natural
 40
 <400> 56
 gctctccga tctnnnnnn 19
 <210> 57
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Construcción sintética
 50
 <400> 57
 gctctccga tct 13

5 <210> 58
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 58
 10 aatgatacgg cgaccaccga gatctacact cttccctac acgagcgtct tccgatct 58
 <210> 59
 <211> 65
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (25)..(31)
 <223> el N de las posiciones 25-31 puede ser cualquier nucleótido natural
 25 <400> 59
 caagcagaag acggcatac agatnnnnn ngtgactgga gttcagacgt gtgctcttcc 60
 gatct 65
 <210> 60
 30 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Construcción sintética
 <400> 60
 aatgatacgg cgaccacc 18
 40 <210> 61
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 61
 50 caagcagaag acggcatac 19
 <210> 62
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Construcción artificial
 <400> 62
 60 aatgatacgg cgaccaccga gat 23
 <210> 63
 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5

<223> Construcción sintética

<400> 63

caagcagaag acggcatacg a

21

10

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de ácido nucleico aislada que comprende la SEQ ID NO.: 1 o 2.
2. Una secuencia de ácido nucleico aislada que tiene una identidad de al menos el 90 % con la SEQ ID NO.: 1 o 2.
- 5 3. Una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica la SEQ ID NO.: 3.
4. Una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 90 % con la SEQ ID NO.: 3.
- 10 5. Un oligonucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO. 4, la SEQ ID NO. 5, la SEQ ID NO. 6, la SEQ ID NO. 7, la SEQ ID NO. 8, la SEQ ID NO. 9, la SEQ ID NO. 10, la SEQ ID NO. 11, la SEQ ID NO. 12, la SEQ ID NO. 13, la SEQ ID NO. 14, la SEQ ID NO. 15, la SEQ ID NO. 16, la SEQ ID NO. 17, la SEQ ID NO. 18 y la SEQ ID NO. 19.
6. Un oligonucleótido de la reivindicación 5, comprendiendo el oligonucleótido un marcador detectable.
- 15 7. Dos o más oligonucleótidos para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico de un virus equino, comprendiendo cada oligonucleótido, una secuencia de ácido nucleico que se corresponde con una porción de al menos 20 o más nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO.: 1 o 2, complementaria de una porción de al menos 20 o más nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO.: 1 o 2, o complementaria de una secuencia de ácido nucleico que codifica una porción de al menos 20 o más aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO.: 3.
8. Los oligonucleótidos de la reivindicación 7, en los que al menos uno de los oligonucleótidos comprende un marcador detectable.
- 20 9. Un par de cebadores seleccionado entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS.: 4 y 5; las SEQ ID NOS.: 6 y 7; las SEQ ID NOS.: 8 y 9; las SEQ ID NOS.: 10 y 11; las SEQ ID NOS.: 12 y 13; las SEQ ID NOS.: 14 y 15; las SEQ ID NOS.: 16 y 17; y las SEQ ID NOS.: 18 y 19.
10. El par de cebadores de la reivindicación 9, en el que al menos un cebador del par comprende un marcador detectable.
- 25 11. Un procedimiento de detección de un virus en una muestra, que comprende la amplificación, a partir de la muestra, de un ácido nucleico usando un oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, o el par de cebadores de las reivindicaciones 9 o 10.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, que comprende adicionalmente la detección del ácido nucleico amplificado.
- 30 13. Un kit para la detección del ácido nucleico de un virus en una muestra, comprendiendo el kit un oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, o el par de cebadores de las reivindicaciones 9 o 10; y uno o más reactivos de amplificación.
14. El kit de la reivindicación 13, en el que el oligonucleótido, al menos uno de los oligonucleótidos, o al menos un cebador del par de cebadores, está unido de forma fija a un soporte sólido.
- 35 15. El kit de la reivindicación 13 o 14 que comprende adicionalmente un oligonucleótido para la detección del ácido nucleico amplificado.
16. Un soporte sólido que comprende, unido de forma fija al mismo, un oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, o al menos un cebador del par de cebadores de las reivindicaciones 9 o 10.
- 40 17. Un procedimiento de detección del virus asociado a la enfermedad de Theiler (TDAV) en una muestra, que comprende la amplificación, a partir de la muestra, de un ácido nucleico usando un oligonucleótido o un par de oligonucleótidos según se define en cualquiera de las reivindicaciones 5-8.
18. El procedimiento de la reivindicación 11 o de la reivindicación 12, o el kit de una cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en el que la muestra se obtiene de un equino.

FIGURA 1

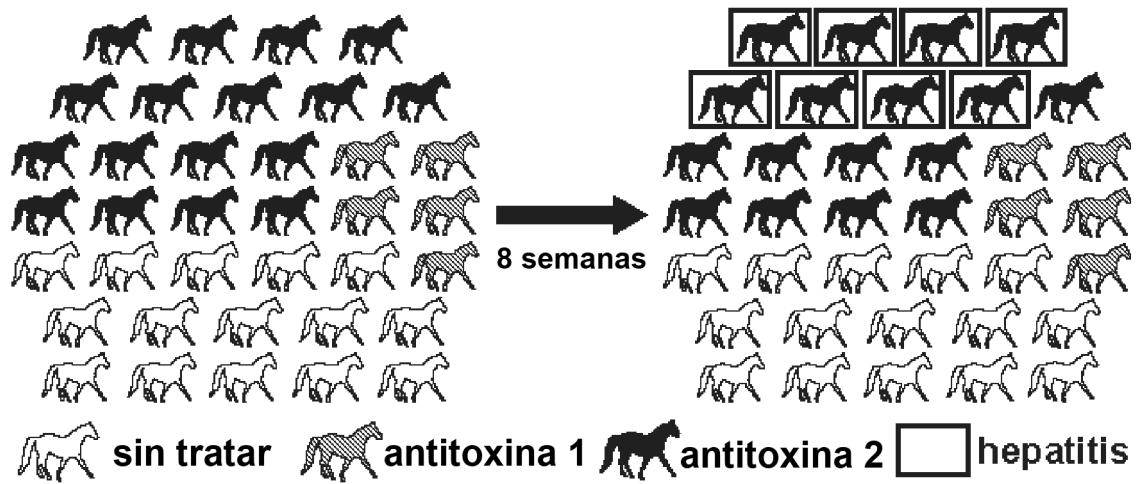


FIGURA 2

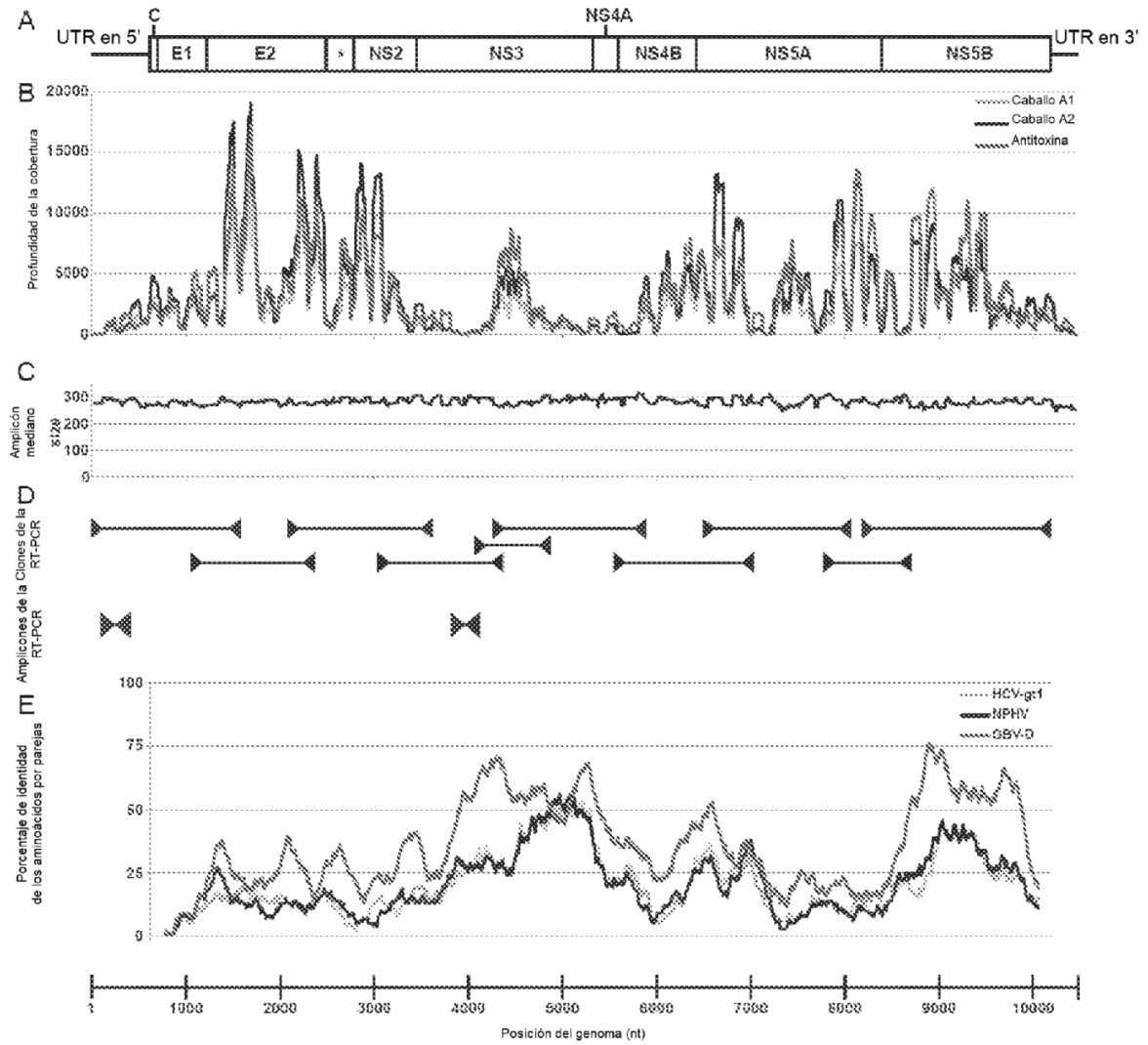


FIGURA 3

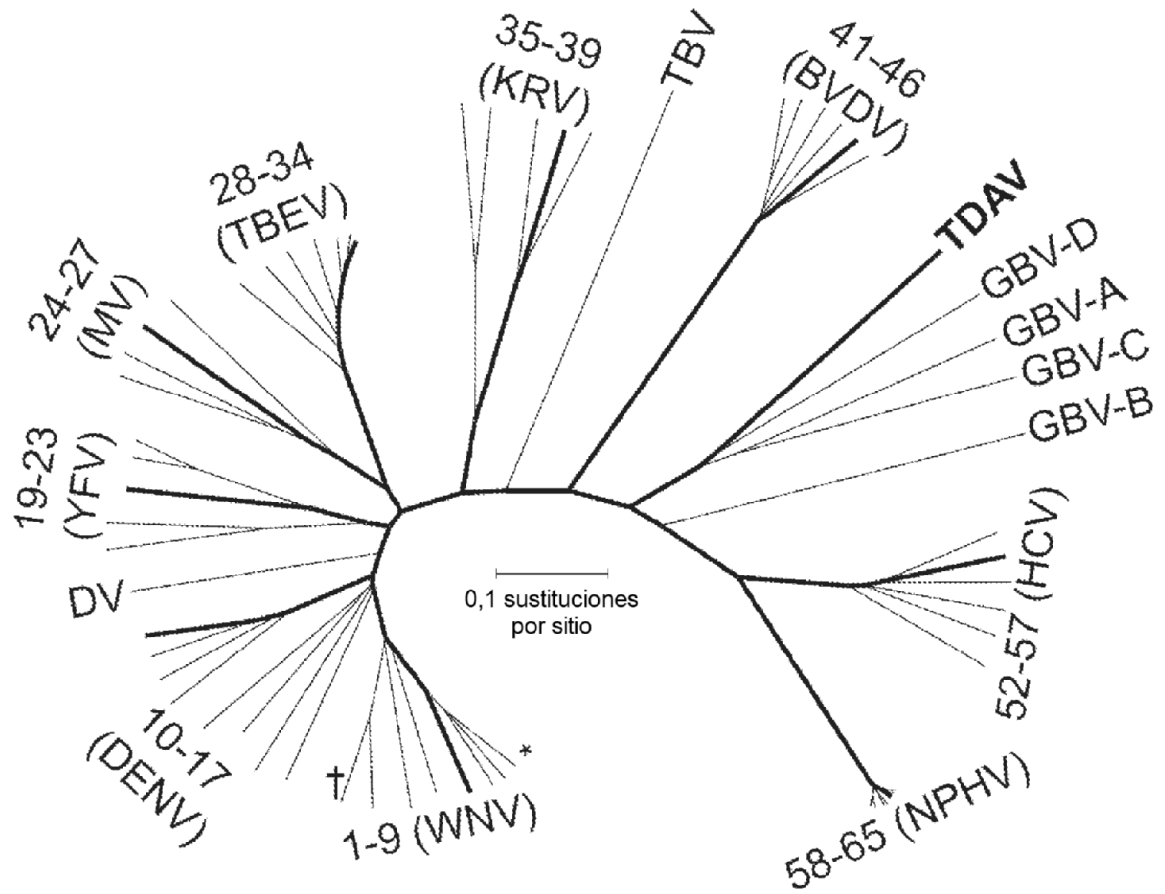


FIGURA 4A

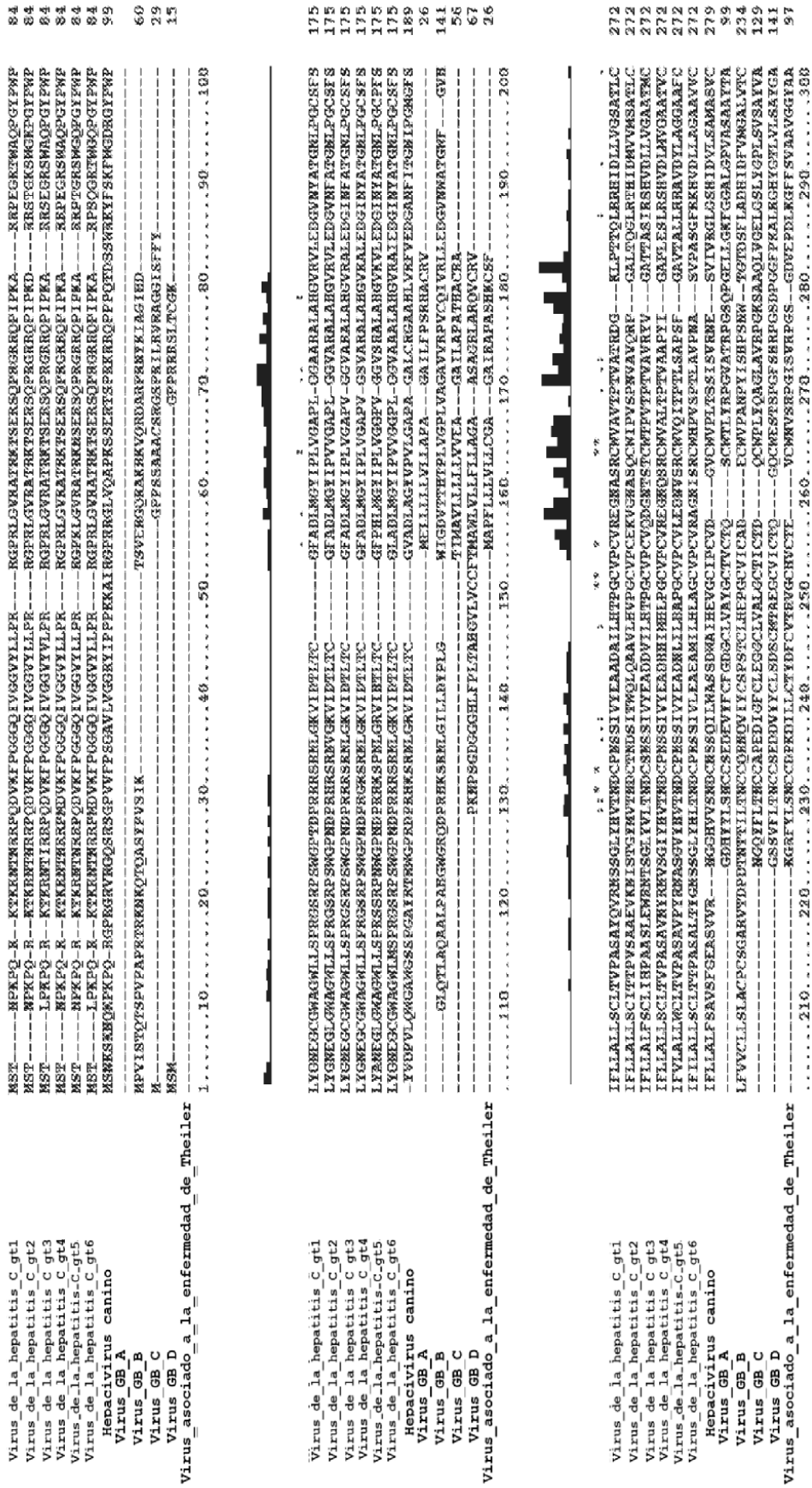


FIGURA 4B

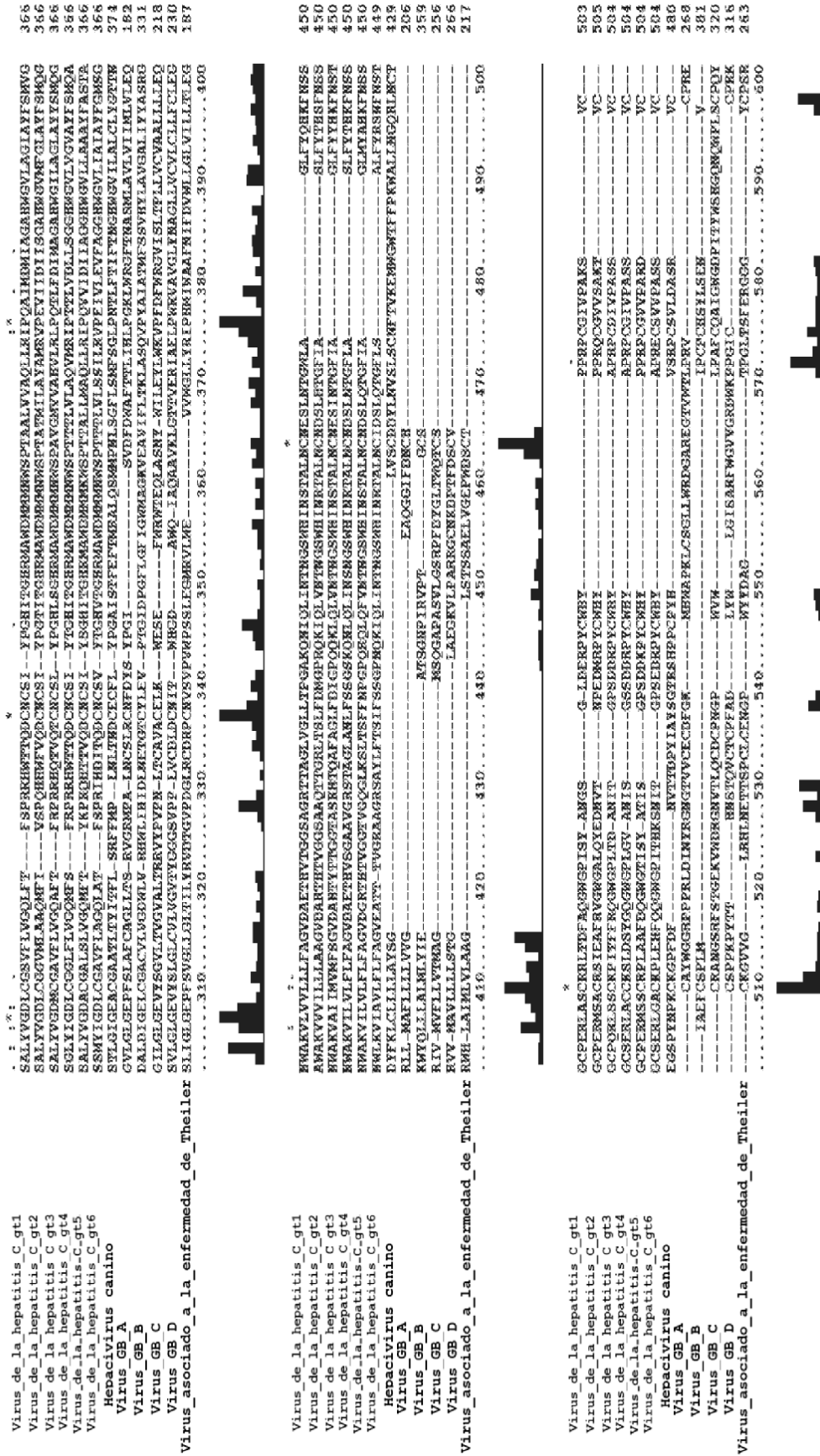


FIGURA 4C

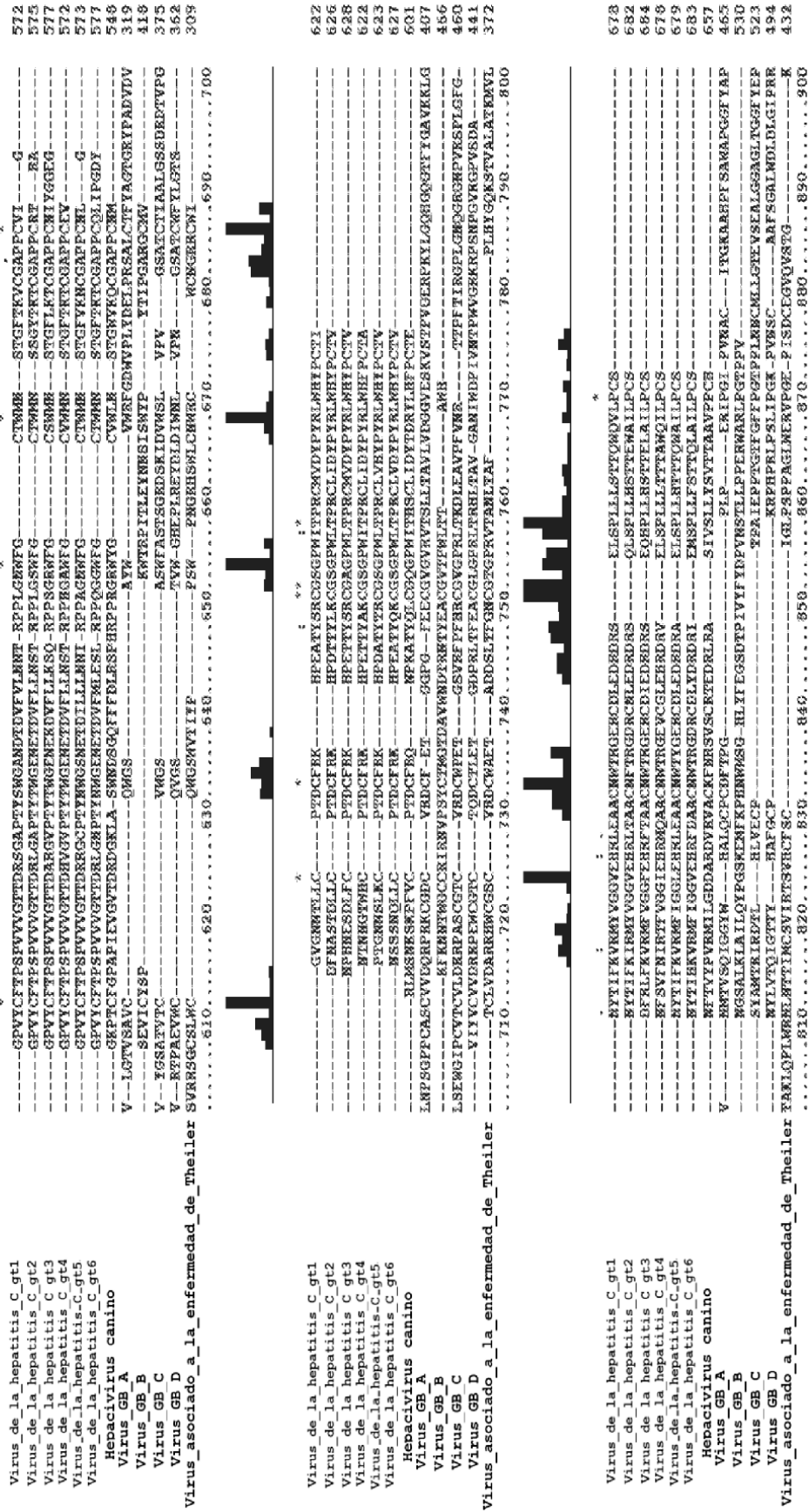


FIGURA 4D

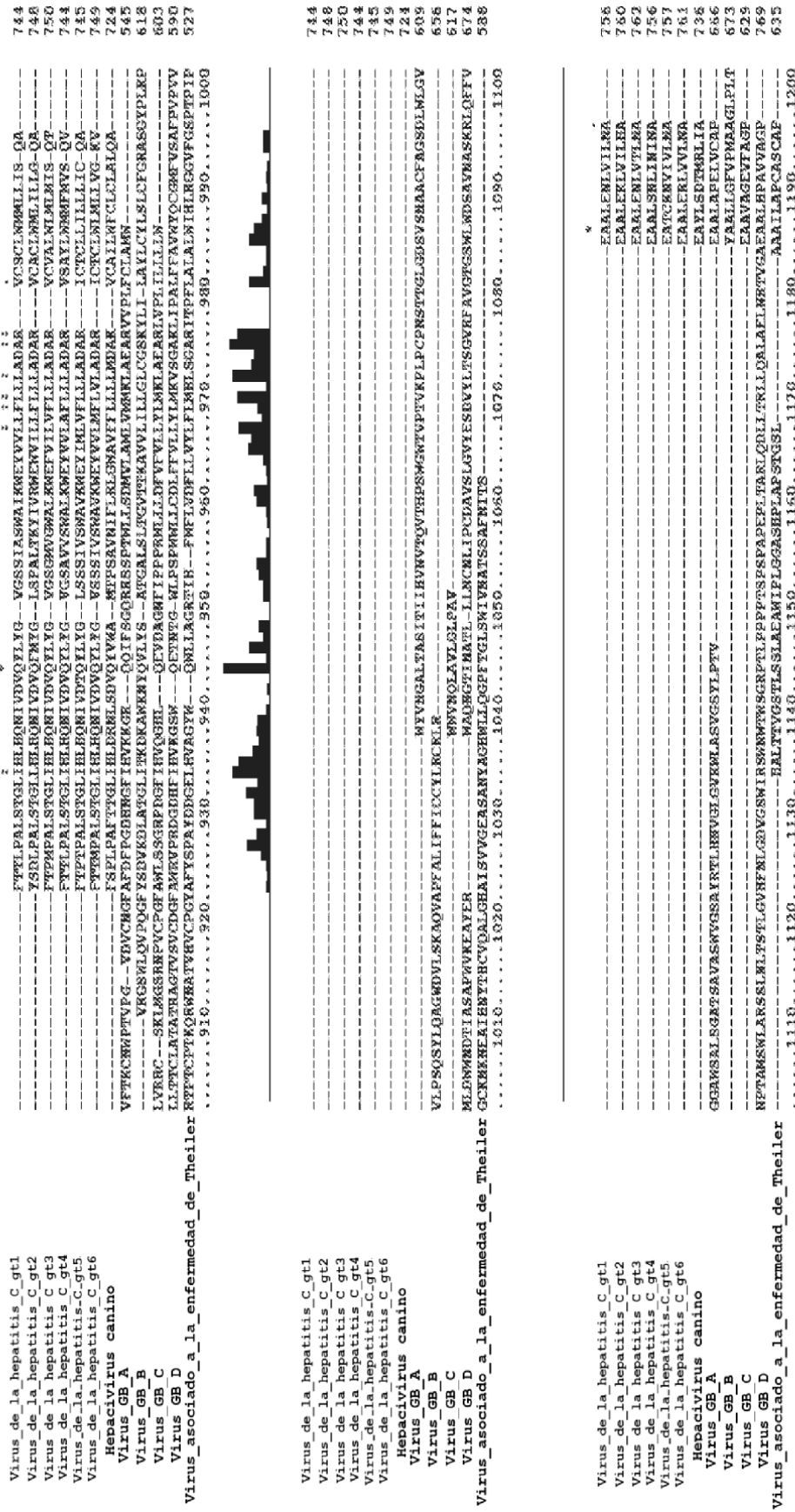


FIGURA 4E

Virus_de_la_hepatitis_C_gtl1
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt2
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt3
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt4
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt5
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt6
 Hepacivirus_canino
 Virus_GB_A
 Virus_GB_B
 Virus_GB_C
 Virus_GB_D
 Virus_asociado_a_la_enfermedad_de_Theiler
 1210.....1220.....1230.....1240.....1250.....1260.....1270.....1280.....1290.....1300



Virus_de_la_hepatitis_C_gtl1
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt2
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt3
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt4
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt5
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt6
 Hepacivirus_canino
 Virus_GB_A
 Virus_GB_B
 Virus_GB_C
 Virus_GB_D
 Virus_asociado_a_la_enfermedad_de_Theiler
 1310.....1320.....1330.....1340.....1350.....1360.....1370.....1380.....1390.....1400



Virus_de_la_hepatitis_C_gtl1
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt2
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt3
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt4
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt5
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt6
 Hepacivirus_canino
 Virus_GB_A
 Virus_GB_B
 Virus_GB_C
 Virus_GB_D
 Virus_asociado_a_la_enfermedad_de_Theiler
 1410.....1420.....1430.....1440.....1450.....1460.....1470.....1480.....1490.....1500



FIGURA 4F

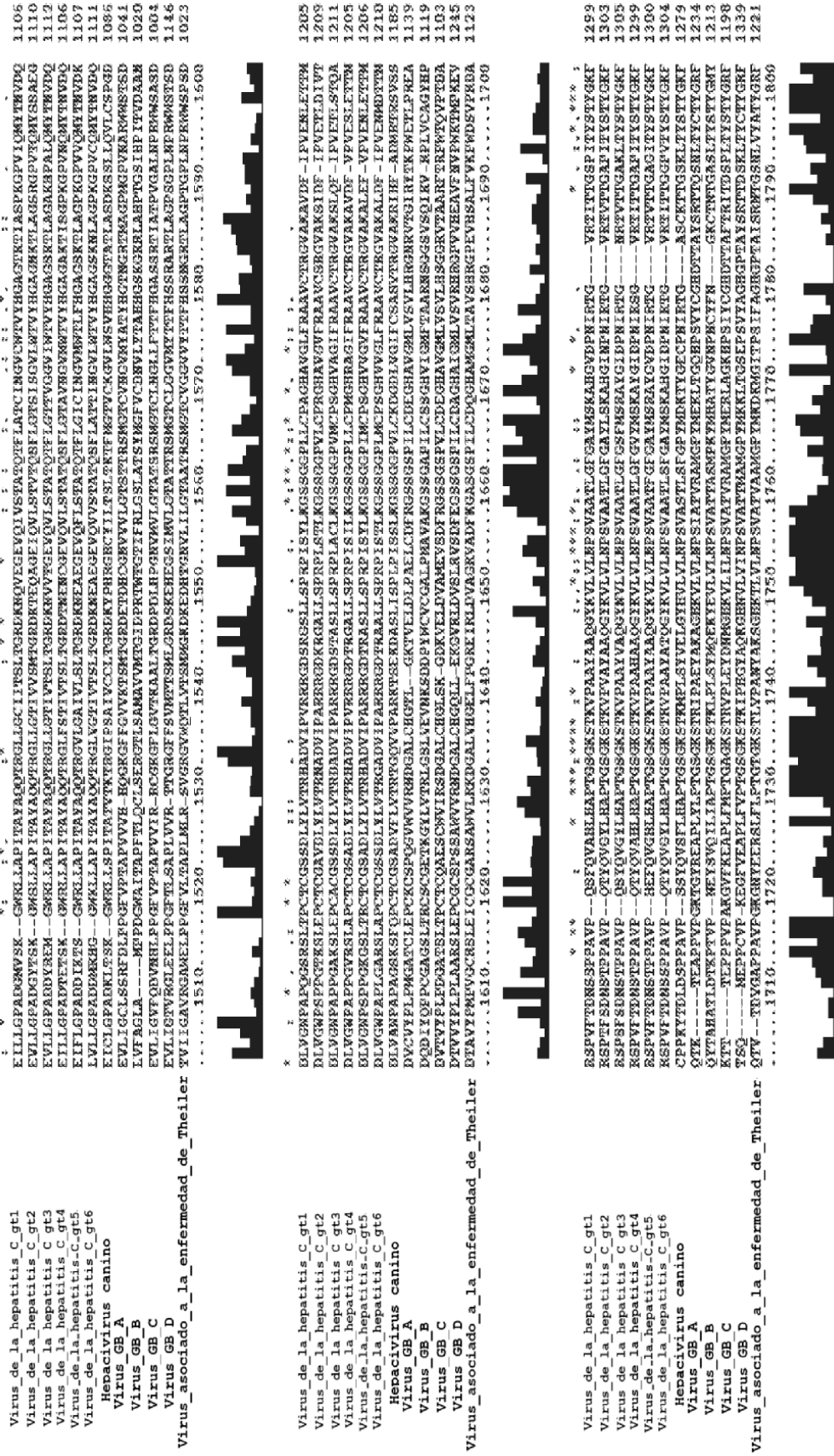


FIGURA 4G

```

: : . . . . . * * * * * x . . . . . * * * * * x * * * * * x * * * * *
LADGCGSGATDIIICDECHSSTAYSIIIGITVLDQAEAGARLVLAATAPPGSVTTPSHPEEVAALSTGEFFYGMARILPVLKGGRELIIFCHSKKK 1399
LADGCGAGADIIICDECHSSTAYSIIIGITVLDQAEAGARLVLAATAPPGSVTTPSHPEEVAALSTGEFFYGMARILPVLKGGRELIIFCHSKKK 1403
LADGCGSGAVDIIICDECHSSTAYSIIIGITVLDQAEAGARLVLAATAPPGSVTTPSHPEEVAALSTGEFFYGMARILPVLKGGRELIIFCHSKKK 1405
LADGCGSGADIIICDECHSSTAYSIIIGITVLDQAEAGARLVLAATAPPGSVTTPSHPEEVAALSTGEFFYGMARILPVLKGGRELIIFCHSKKK 1399
FADGCGSGADIIICDECHSSTAYSIIIGITVLDQAEAGARLVLAATAPPGSVTTPSHPEEVAALSTGEFFYGMARILPVLKGGRELIIFCHSKKK 1400
LADGCGSGADIIICDECHSSTAYSIIIGITVLDQAEAGARLVLAATAPPGSVTTPSHPEEVAALSTGEFFYGMARILPVLKGGRELIIFCHSKKK 1404
LADGCVSAGADIIICDECHSSTAYSIIIGITVLDQAEAGARLVLAATAPPGSVTTPSHPEEVAALSTGEFFYGMARILPVLKGGRELIIFCHSKKK 1379
MAMPKRYLGRHVVIIICDECHSSTAYSIIIGITVLDQAEAGARLVLAATAPPGSVTTPSHPEEVAALSTGEFFYGMARILPVLKGGRELIIFCHSKKK 1334
LT--GACSRNTDIIICDECHSSTAYSIIIGITVLDQAEAGARLVLAATAPPGSVTTPSHPEEVAALSTGEFFYGMARILPVLKGGRELIIFCHSKKK 1311
LAMPKRLGVSVDIIICDECHSSTAYSIIIGITVLDQAEAGARLVLAATAPPGSVTTPSHPEEVAALSTGEFFYGMARILPVLKGGRELIIFCHSKKK 1297
LTPVPELKMVVVDECHSSTAYSIIIGITVLDQAEAGARLVLAATAPPGSVTTPSHPEEVAALSTGEFFYGMARILPVLKGGRELIIFCHSKKK 1439
LAKRRLDGVSVILDECHSSTAYSIIIGITVLDQAEAGARLVLAATAPPGSVTTPSHPEEVAALSTGEFFYGMARILPVLKGGRELIIFCHSKKK 1321
.....1810.....1830.....1840.....1850.....1860.....1870.....1880.....1890.....1900

```



```

CBLAKALVALGINAVAYRGLDVSIVPTSGDVVVVSTALMAGFYGDFDSVIDNYCVYQVYDIFSLDPTTIEETLLODVAYSKORRGTGRRGKPGIY 1499
CDELARLKRSGEISVAIYRGLDVSIVPTSGDVVVVSTALMAGFYGDFDSVIDNYCVYQVYDIFSLDPTTIEETLLODVAYSKORRGTGRRGKPGIY 1503
CBEIASKRGMKMAVAYRGLDVSIVPTSGDVVVVSTALMAGFYGDFDSVIDNYCVYQVYDIFSLDPTTIEETLLODVAYSKORRGTGRRGKPGIY 1505
CDELARLQTLSELMAVAYRGLDVSIVPTSGDVVVVSTALMAGFYGDFDSVIDNYCVYQVYDIFSLDPTTIEETLLODVAYSKORRGTGRRGKPGIY 1499
CBEIASKOLISLGMVAVAYRGLDVSIVPTSGDVVVVSTALMAGFYGDFDSVIDNYCVYQVYDIFSLDPTTIEETLLODVAYSKORRGTGRRGKPGIY 1500
CDELAKOLISLGMVAVAYRGLDVSIVPTSGDVVVVSTALMAGFYGDFDSVIDNYCVYQVYDIFSLDPTTIEETLLODVAYSKORRGTGRRGKPGIY 1504
CEEVAILLKRKAGAVAYRGLDVSIVPTSGDVVVVSTALMAGFYGDFDSVIDNYCVYQVYDIFSLDPTTIEETLLODVAYSKORRGTGRRGKPGIY 1479
CERFCALSALEVSATVYRGLDVSIVPTSGDVVVVSTALMAGFYGDFDSVIDNYCVYQVYDIFSLDPTTIEETLLODVAYSKORRGTGRRGKPGIY 1432
CDELAMELARKGITRAYSIVRGLDVSIVPTSGDVVVVSTALMAGFYGDFDSVIDNYCVYQVYDIFSLDPTTIEETLLODVAYSKORRGTGRRGKPGIY 1410
CERLAGQFSRGRVNRHAIYRGLDVSIVPTSGDVVVVSTALMAGFYGDFDSVIDNYCVYQVYDIFSLDPTTIEETLLODVAYSKORRGTGRRGKPGIY 1396
CERHAYGFTKAGCRAMFTYRGLDVSIVPTSGDVVVVSTALMAGFYGDFDSVIDNYCVYQVYDIFSLDPTTIEETLLODVAYSKORRGTGRRGKPGIY 1539
AERYASALITRAGVAKAMFHYRGLDVSIVPTSGDVVVVSTALMAGFYGDFDSVIDNYCVYQVYDIFSLDPTTIEETLLODVAYSKORRGTGRRGKPGIY 1421
.....1910.....1920.....1930.....1940.....1950.....1960.....1970.....1980.....1990.....2000

```



```

RFVAPGERPSGMFDSVILECYDAGCAWYELTTPAETTVRIKAVYMTFGLVFCODRLEFMEGFTGLTHIDARF--LSQTKOSGEMFPIVAVOATVCCARAO 1598
RYVSTGERKASGMFDSVILECYDAGCAWYELTTPAETTVRIKAVYMTFGLVFCODRLEFMEGFTGLTHIDARF--LSQTKOSGEMFPIVAVOATVCCARAK 1602
RYVASGERPSGMFDSVILECYDAGCAWYELTTPAETTVRIKAVYMTFGLVFCODRLEFMEGFTGLTHIDARF--LSQTKOSGEMFPIVAVOATVCCARAO 1604
RYVTPGERPSGMFDSVILECYDAGCAWYELTTPAETTVRIKAVYMTFGLVFCODRLEFMEGFTGLTHIDARF--LSQTKOSGEMFPIVAVOATVCCARAO 1598
RYVSSGERPSGMFDSVILECYDAGCAWYELTTPAETTVRIKAVYMTFGLVFCODRLEFMEGFTGLTHIDARF--LSQTKOSGEMFPIVAVOATVCCARAK 1599
RYVSSGERPSGMFDSVILECYDAGCAWYELTTPAETTVRIKAVYMTFGLVFCODRLEFMEGFTGLTHIDARF--LSQTKOSGEMFPIVAVOATVCCARAK 1603
RYVNSGERPSGMFDSVILECYDAGCAWYELTTPAETTVRIKAVYMTFGLVFCODRLEFMEGFTGLTHIDARF--LSQTKOSGEMFPIVAVOATVCCARAO 1578
YSALAAAPAGPVRSGALMAAVAGVYMYHLEPELFTGBILIRAYDSCPTAAITASAVGEAIFTSGLVYMRBIPQVYVAKOKSHAWMLLVGVOROMCEAAG 1532
YVWBSCTPSSGMVFCMIVAFDAKAKAYHLSHLEAGTILDTKNTQSGLPAAIGARLDEMAADLFSWVWPEPSF--VWTKATYRHHYVLLITRAALGLCRQYF 1508
YVAGVSKAPAGVVRSGPVNSAVEAGVTVYGMETJAMILLRLYDQCPYTAARAOIIGEAADVFSGLAPLRHHPDPVSWAVRVRVWMLLVGVOROMCEAAG 1496
YFCLDGAAPSSTVPSCTVWAGVAAVYVYHGLKPSFAADALRYVGSCHYPTBVSSELSDAVVFCGLVYRHEMVTVCWAGVWQVMPILLTGVOROMCEAAG 1639
RYCLASEPDCVTPVPSGAVVAFRAALRYVYHGLKPSFAADALRYVGSCHYPTBVSSELSDAVVFCGLVYRHEMVTVCWAGVWQVMPILLTGVOROMCEAAG 1521
.....2010.....2020.....2030.....2040.....2050.....2060.....2070.....2080.....2090.....2100

```



Virus_de_la_hepatitis_C_gt1
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt2
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt3
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt4
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt5
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt6
 Hepacivirus canino
 Virus_GB_A
 Virus_GB_B
 Virus_GB_C
 Virus_GB_D
 Virus_asociado_a_la_enfermedad_de_Theiler

Virus_de_la_hepatitis_C_gt1
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt2
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt3
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt4
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt5
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt6
 Hepacivirus canino
 Virus_GB_A
 Virus_GB_B
 Virus_GB_C
 Virus_GB_D
 Virus_asociado_a_la_enfermedad_de_Theiler

Virus_de_la_hepatitis_C_gt1
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt2
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt3
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt4
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt5
 Virus_de_la_hepatitis_C_gt6
 Hepacivirus canino
 Virus_GB_A
 Virus_GB_B
 Virus_GB_C
 Virus_GB_D
 Virus_asociado_a_la_enfermedad_de_Theiler

FIGURA 4H

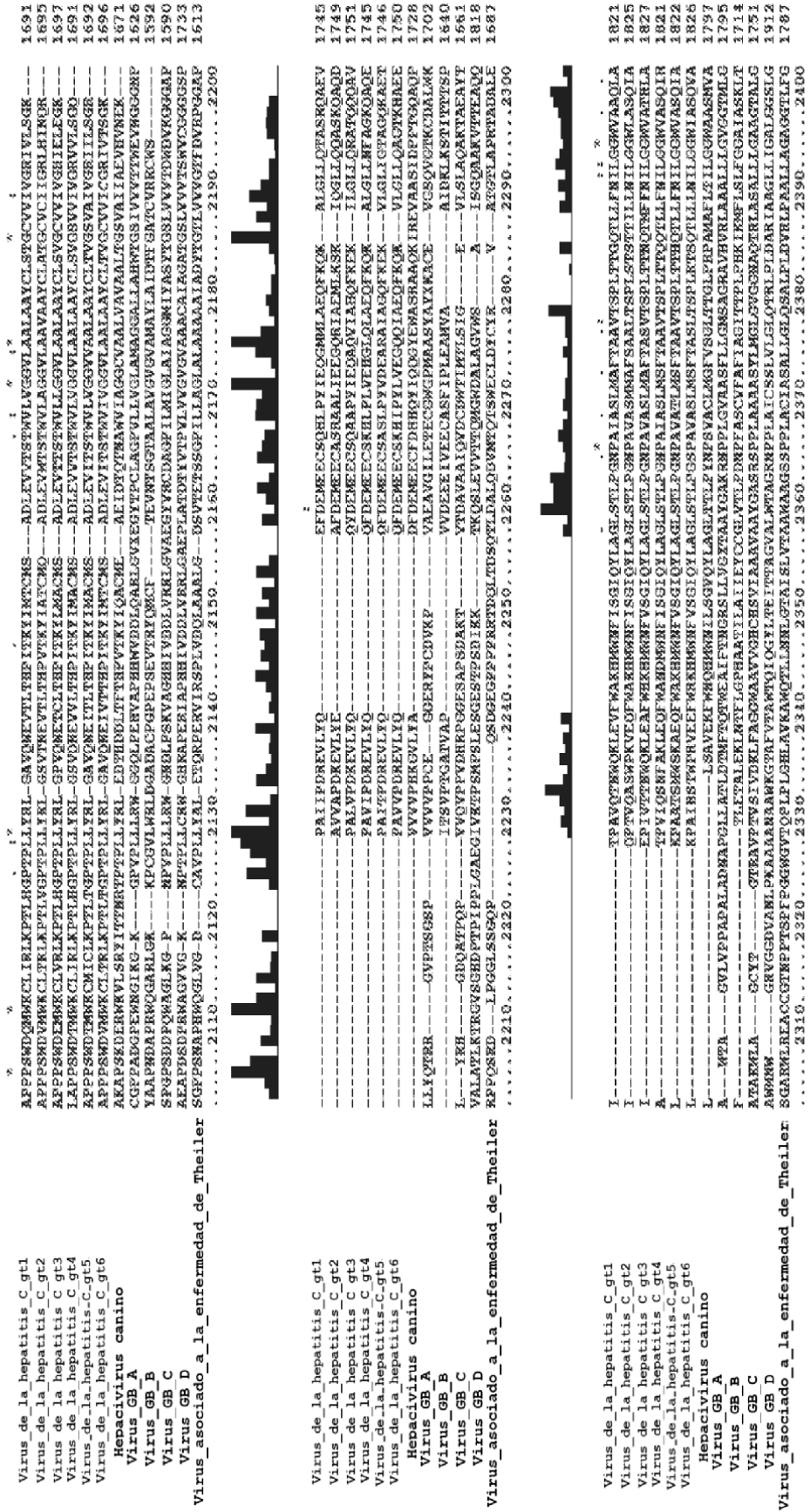


FIGURA 4I

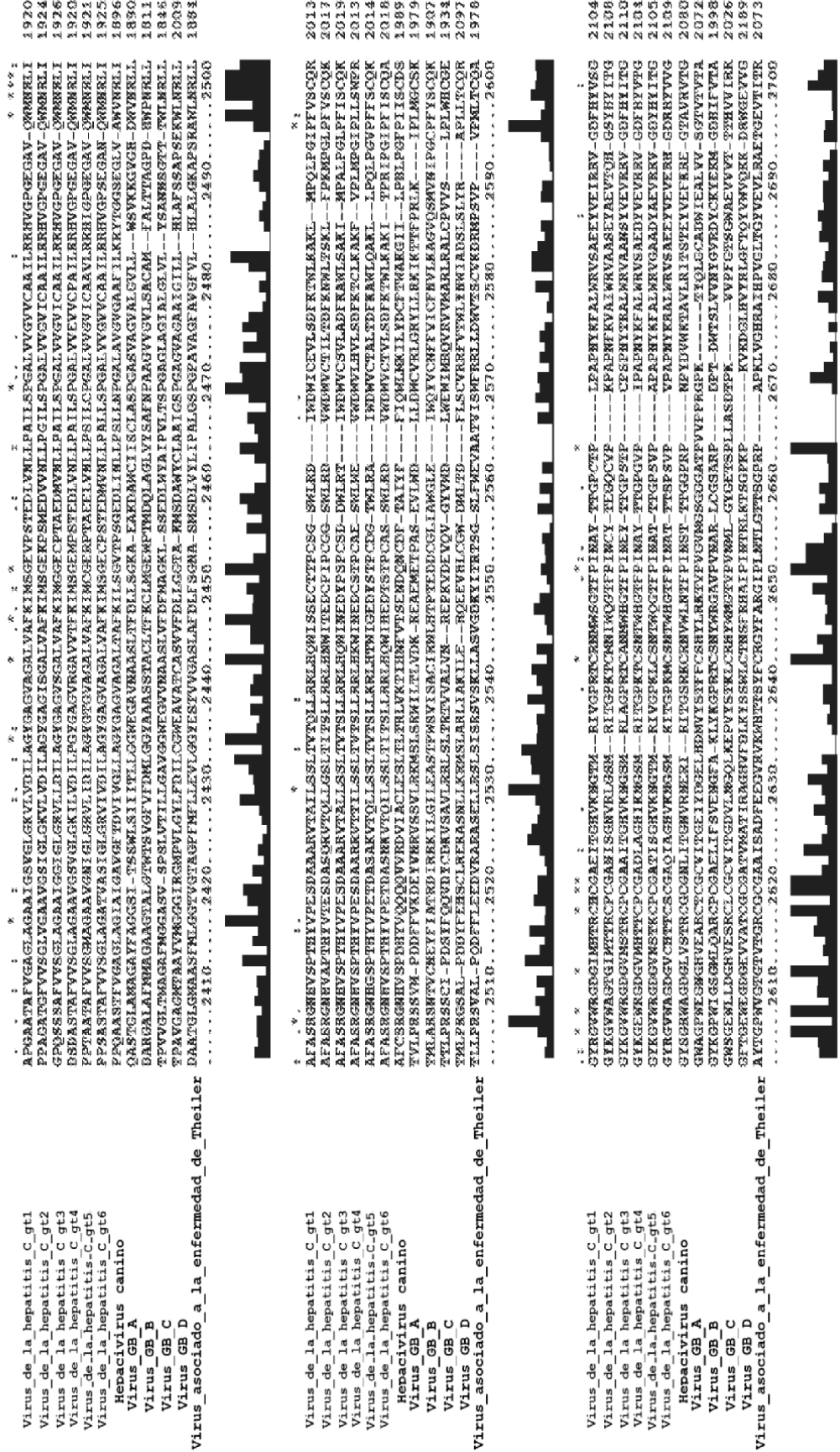


FIGURA 4J

Virus de la hepatitis C gtl1	KCP	COIPSPPEFFTELDGVR	2138
Virus de la hepatitis C_gt2	KVP	COLESPEFFSWDGVQ	2133
Virus de la hepatitis C_gt3	KFP	COVFARELFTEVDGVR	2139
Virus de la hepatitis C_gt4	KFP	COVFAELFLTEVDGIR	2139
Virus de la hepatitis C_gt5	KCP	COVPSPEFFTELDGVR	2130
Virus de la hepatitis C_gt6	KCP	COVPSPEFFTEVDGVR	2134
Hepacivirus canino	RIP	COVPEPLKTF LMGVR	2135
Virus GB A	SSAYDTRAEVRAVKAASFAGELPVSWEAZICRP	AMVYRGSQTIQLDGVARTLPCGLP	2132
Virus GB B	VSSPWVCFQVPTLRAAVAVDGVQCVLGEPKTPTWTSRCCYGP	DMRGRKTV	2051
Virus GB C	TSAYKLRDQIILSAVAEFTVYDGI PVSWDARARF	AMVYRGSQSVTIDGERTVLPKHOLR	2086
Virus GB D	ASISPTREIIRIQAVRMKPCVVDGSEVCF SMSFEGP	ARLYGPKRVTVDGEHSLVLSV - SFI PRFEGTA	2258
Virus asociado_a_la_enfermedad_de_Theiler	TYEHLZHDQLLALRQPPYQVGVVCSLKYASALL	AMVYRGSQVYDGEHSLVLSV - SFI PRFEGTA	2189
	2740.....2750.....2760.....2770.....2780.....2790.....2800	
	2740.....2750.....2760.....2770.....2780.....2790.....2800	
Virus de la hepatitis C_gt1	LRRFAPCKPELLREEVAFVGLHEFVWSGLFCPEPDDV	A-VL	2171
Virus de la hepatitis C_gt2	LRRFAPCKPELLREEVAFVGLHEFVWSGLFCPEPDDV	B-VL	2175
Virus de la hepatitis C_gt3	LRRFAPCKPELLREEVAFVGLHEFVWSGLFCPEPDDV	8-VL	2177
Virus de la hepatitis C_gt4	LRRFAPCKPELLREEVAFVGLHEFVWSGLFCPEPDDV	A-VL	2171
Virus de la hepatitis C_gt5	LRRFAPCKPELLREEVAFVGLHEFVWSGLFCPEPDDV	T-VL	2172
Virus de la hepatitis C_gt6	LRRFAPCKPELLREEVAFVGLHEFVWSGLFCPEPDDV	R-VV	2176
Hepacivirus canino	LRRFAPCKPELLREEVAFVGLHEFVWSGLFCPEPDDV	R-TV	2147
Virus GB A	LRRFAPCKPELLREEVAFVGLHEFVWSGLFCPEPDDV	R-TV	2147
Virus GB B	LRRFAPCKPELLREEVAFVGLHEFVWSGLFCPEPDDV	R-TV	2147
Virus GB C	LRRFAPCKPELLREEVAFVGLHEFVWSGLFCPEPDDV	R-TV	2147
Virus GB D	LRRFAPCKPELLREEVAFVGLHEFVWSGLFCPEPDDV	R-TV	2147
Virus asociado_a_la_enfermedad_de_Theiler	LRRFAPCKPELLREEVAFVGLHEFVWSGLFCPEPDDV	R-TV	2147
	2810.....2820.....2830.....2840.....2850.....2860.....2870.....2880.....2890.....2900	
	2810.....2820.....2830.....2840.....2850.....2860.....2870.....2880.....2890.....2900	
Virus de la hepatitis C_gt1	TDPSSHITAEAGRRLARGSPFSMASSS	ASOLSAPSLK	2218
Virus de la hepatitis C_gt2	TDPSSHITAEAGRRLARGSPFSMASSS	ASOLSAPSLK	2222
Virus de la hepatitis C_gt3	TDPSSHITAEAGRRLARGSPFSMASSS	ASOLSAPSLK	2224
Virus de la hepatitis C_gt4	TDPSSHITAEAGRRLARGSPFSMASSS	ASOLSAPSLK	2218
Virus de la hepatitis C_gt5	TDPSSHITAEAGRRLARGSPFSMASSS	ASOLSAPSLK	2219
Virus de la hepatitis C_gt6	TDPSSHITAEAGRRLARGSPFSMASSS	ASOLSAPSLK	2243
Hepacivirus canino	TDPSSHITAEAGRRLARGSPFSMASSS	ASOLSAPSLK	2243
Virus GB A	TDPSSHITAEAGRRLARGSPFSMASSS	ASOLSAPSLK	2243
Virus GB B	TDPSSHITAEAGRRLARGSPFSMASSS	ASOLSAPSLK	2243
Virus GB C	TDPSSHITAEAGRRLARGSPFSMASSS	ASOLSAPSLK	2243
Virus GB D	TDPSSHITAEAGRRLARGSPFSMASSS	ASOLSAPSLK	2243
Virus asociado_a_la_enfermedad_de_Theiler	TDPSSHITAEAGRRLARGSPFSMASSS	ASOLSAPSLK	2243
	2910.....2920.....2930.....2940.....2950.....2960.....2970.....2980.....2990.....3000	
	2910.....2920.....2930.....2940.....2950.....2960.....2970.....2980.....2990.....3000	

FIGURA 4K

Virus_de_la_hepatitis_C_gt1	HDSDAALILAMILMRQEMGNITRVESEKVVILDSFDPLVAELDERVSVVPAALILRKSRFAKALFV	2287			
Virus_de_la_hepatitis_C_gt2	GKATVDWVDAMLFMGQVTRIEGSAVWVDSLQPMVEERSLLIPISEVIMLPK	2287			
Virus_de_la_hepatitis_C_gt3	KPHDAILVDAMLRQEMGNITRVESEKVVILDSFEPLRAFTDEVLPISEVIMLPKKFPALPI	2293			
Virus_de_la_hepatitis_C_gt4	HDSPGTBLEAMLLMGSAFKVTEKVVILDSFESCVAEOMDREYSVAALILRKSKFPALPI	2284			
Virus_de_la_hepatitis_C_gt5	GHRDADLIEAMLRQEMGNITRVESEKVVILDSFKPLACEFDREISVSAFCFKKSPAFPPALFV	2288			
Virus_de_la_hepatitis_C_gt6	GBHDAFLIEAMLRQEMGNITRVESEKVVILDSFDPLVAEYDREISVSAFCFKKSPAFPPALFV	2293			
Hepacivirus canino	EEHEMAGGVPPLTGEDELAHLESTFQKSVTIEVDKVVIFDSMTIWSSESEKESVRAIPPLVAEYDREISVSAFCFKKSPAFPPALFV	2293			
Virus_GB_A	ACTLFDIEAKAKAKALTRLDYLEAVVKAESIKWIKAPLASERANQSLTLTLPFRSIVGVNPELQSSQLEPNSLESSDQDRVVVVAPPFPQGA	2304			
Virus_GB_B	KQFRANQSLTLTLPFRSIVGVNPELQSSQLEPNSLESSDQDRVVVVAPPFPQGA	2304			
Virus_GB_C	EDIPKTFSPALISVILSSDEKIFSVSSQDFTSPSSDIFVIQESETA	2209			
Virus_GB_D	ATYEFVAPALEILIGESPIVPPASAVSAVVAATETVLAASWV	2409			
Virus_asociado_a_la_enfermedad_de_Theiler	STPEPDTVHGAVAVAKATLGTVAALTAATGNSSEASPVLPEPQVHVHLLTAPCFNHDPGV	2430			
3010302030303040305030603070308030903100
Virus_de_la_hepatitis_C_gt1	WARDVNPPLVETRKKPDYCFPVVYGGCLPPEKSPVP
Virus_de_la_hepatitis_C_gt2	WARDVNPPLVETRKKPDYCFPVVYGGCLPPEKSPVP
Virus_de_la_hepatitis_C_gt3	WARDVNPPLVETRKKPDYCFPVVYGGCLPPEKSPVP
Virus_de_la_hepatitis_C_gt4	WARDVNPPLVETRKKPDYCFPVVYGGCLPPEKSPVP
Virus_de_la_hepatitis_C_gt5	WARDVNPPLVETRKKPDYCFPVVYGGCLPPEKSPVP
Virus_de_la_hepatitis_C_gt6	WARDVNPPLVETRKKPDYCFPVVYGGCLPPEKSPVP
Hepacivirus canino	WMEKDYVALVSGGPIKGSAPFEP
Virus_GB_A	LQLEMPAPLIGAGECMFFTAIGCAMTETGGGFD
Virus_GB_B	LQLEMPAPLIGAGECMFFTAIGCAMTETGGGFD
Virus_GB_C	TEGEESVTVRALSVLKAALF
Virus_GB_D	TVAAAAALMCKGKKAAYVGLGARPKKRSADTKII
Virus_asociado_a_la_enfermedad_de_Theiler	LCTGADITLAVGLVHAGGFRHRSFWNGVRRGTRVASLCTAVSYVTCMSTSGSCSTLPAEPVRS
3110312031303140315031603170318031903200
Virus_de_la_hepatitis_C_gt1	STALAEATKSFGSSSTSGITGQNTTTSSEPAFGCCFPD
Virus_de_la_hepatitis_C_gt2	GNLQALIKSFGQPPSGDSGLSTGSAADSGSOTFPDELAKLSTGSISSMPEPL
Virus_de_la_hepatitis_C_gt3	SALAKALIKSFGQPPSGDSGLSTGSAADSGSOTFPDELAKLSTGSISSMPEPL
Virus_de_la_hepatitis_C_gt4	STALAEATKSFGQPPSGDSGLSTGSAADSGSOTFPDELAKLSTGSISSMPEPL
Virus_de_la_hepatitis_C_gt5	SVMADLADAREKVTYSIEQQSNLQSGSMDSBEKEKQDWDADAAKSSMPEPL
Virus_de_la_hepatitis_C_gt6	SQALQALADAVFVEDZTSEPSGLGGSINGSPSPDTTA
Hepacivirus canino	SEPSATESAVFEEKEEPKVDKSEED
Virus_GB_A	CDRSTLXLIFLSFSVGEALFVRIYDEDLIRDEVREIQTPLTD
Virus_GB_B	SEWSDESMSTFASVYTPYPIKIGKDS
Virus_GB_C	VEKSVTRFFSLGLTVADVASLCEMELQMBTAYCQVR
Virus_GB_D	ERKSRVVDGALVYKELLVAGMDCHQIYDEGCTVVEEDGCVSELGHWLKLSEL
Virus_asociado_a_la_enfermedad_de_Theiler	QMSRBYFGMFTLSDCDGFAIFRPSHLLFGWRVLTETRV
3210322032303240325032603270328032903300

FIGURA 4N

Virus de la hepatitis C gt1	-----RWFFCLLLLAGVCIYLLPWR--	3011
Virus de la hepatitis C gt2	-----RLLFGLLLFVGVGLFLLPAR--	3033
Virus de la hepatitis C gt3	-----RHLLCLLLFTVGVGFIPLPAR--	3021
Virus de la hepatitis C gt4	-----RYLLCLLLFTVGVGFIPLPAR--	3008
Virus de la hepatitis C gt5	-----RWLLCLLLSVGVGFIPLPAR--	3014
Virus de la hepatitis C gt6	-----RLLLGLLLFTVGVGFIPLPAR--	3019
Hepacivirus canino	-----RWI--FLILLIPLARILYFKK--	2942
Virus GB A	-----SWNEFPWIKWTGMIIRLVAVMI--	2967
Virus GB B	-----KFLVRYLAVYVFAVGLIAYGLAIS	2864
Virus GB C	-----DFTSQRSEW--	2873
Virus GB D	-----WYPRGVVGRN--	3106
Virus asociado a la enfermedad de Theiler	-----GKPIRNSLGLFVSRICSFVGDIPATYAEYALGHEVWGHALAGYWLFFWV--	3189
3910.....3920.....3930.....3940.....3950.....	

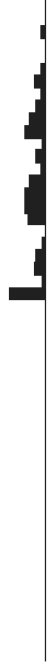


FIGURA 5

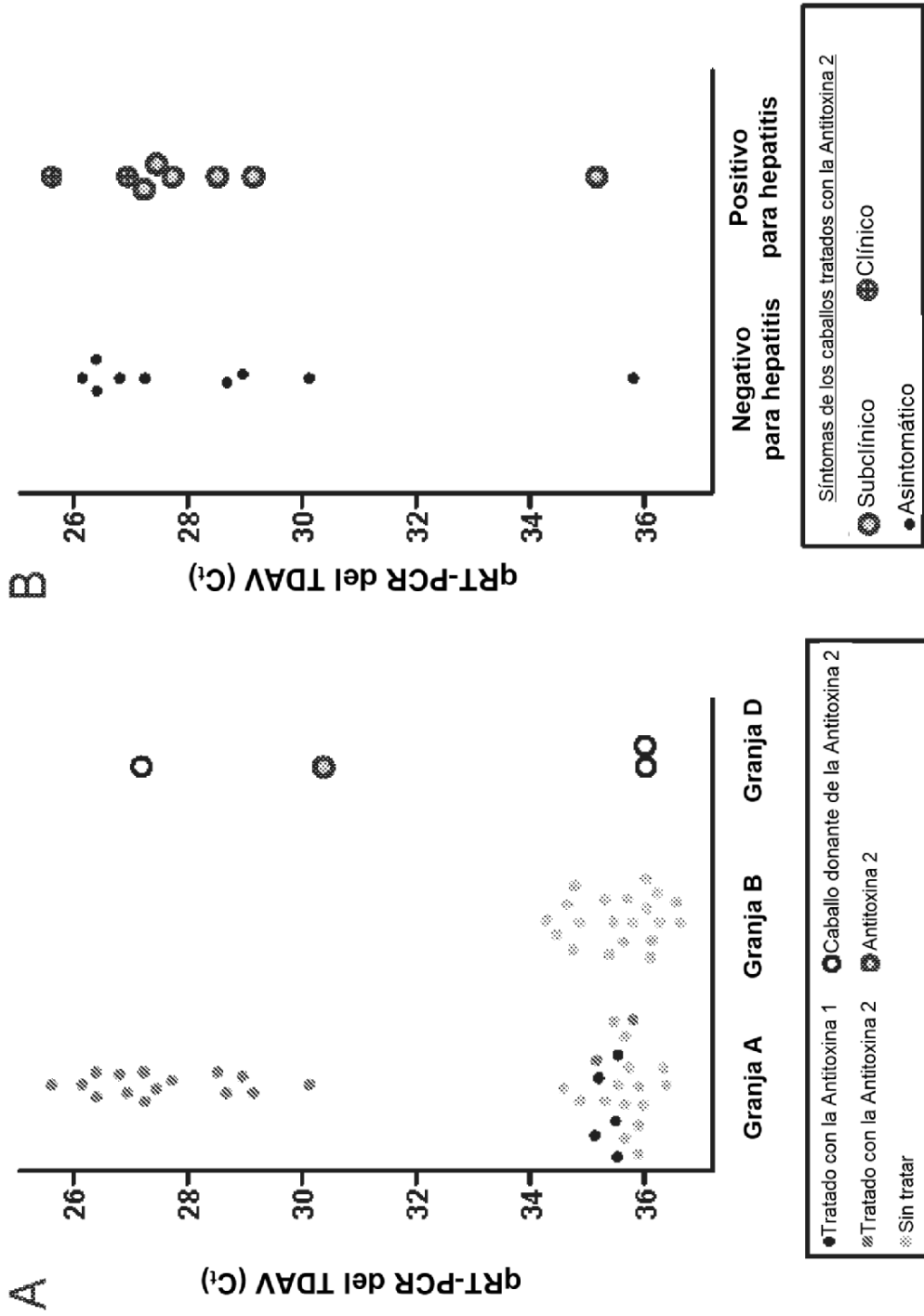


FIGURA 6

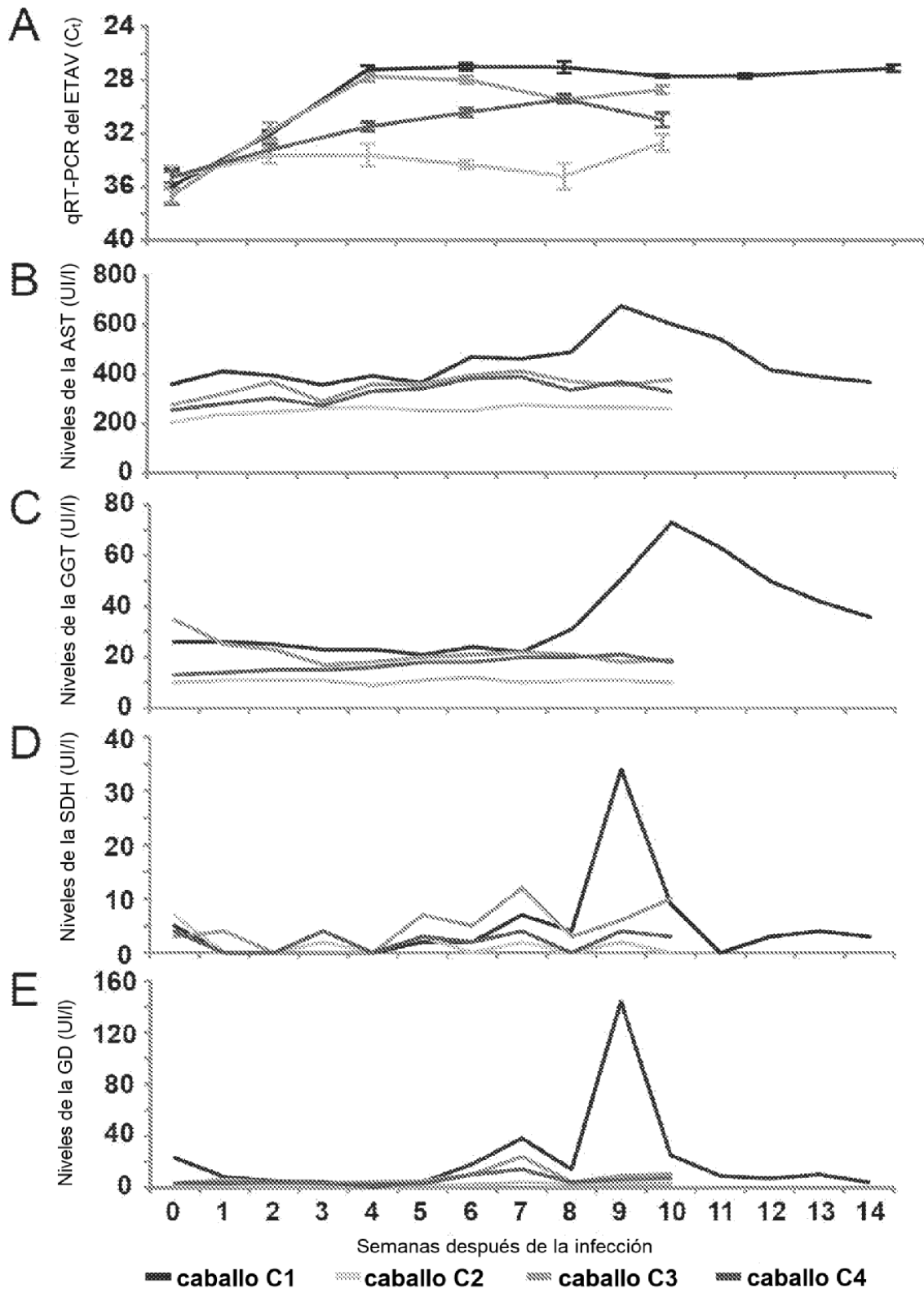


FIGURA 7

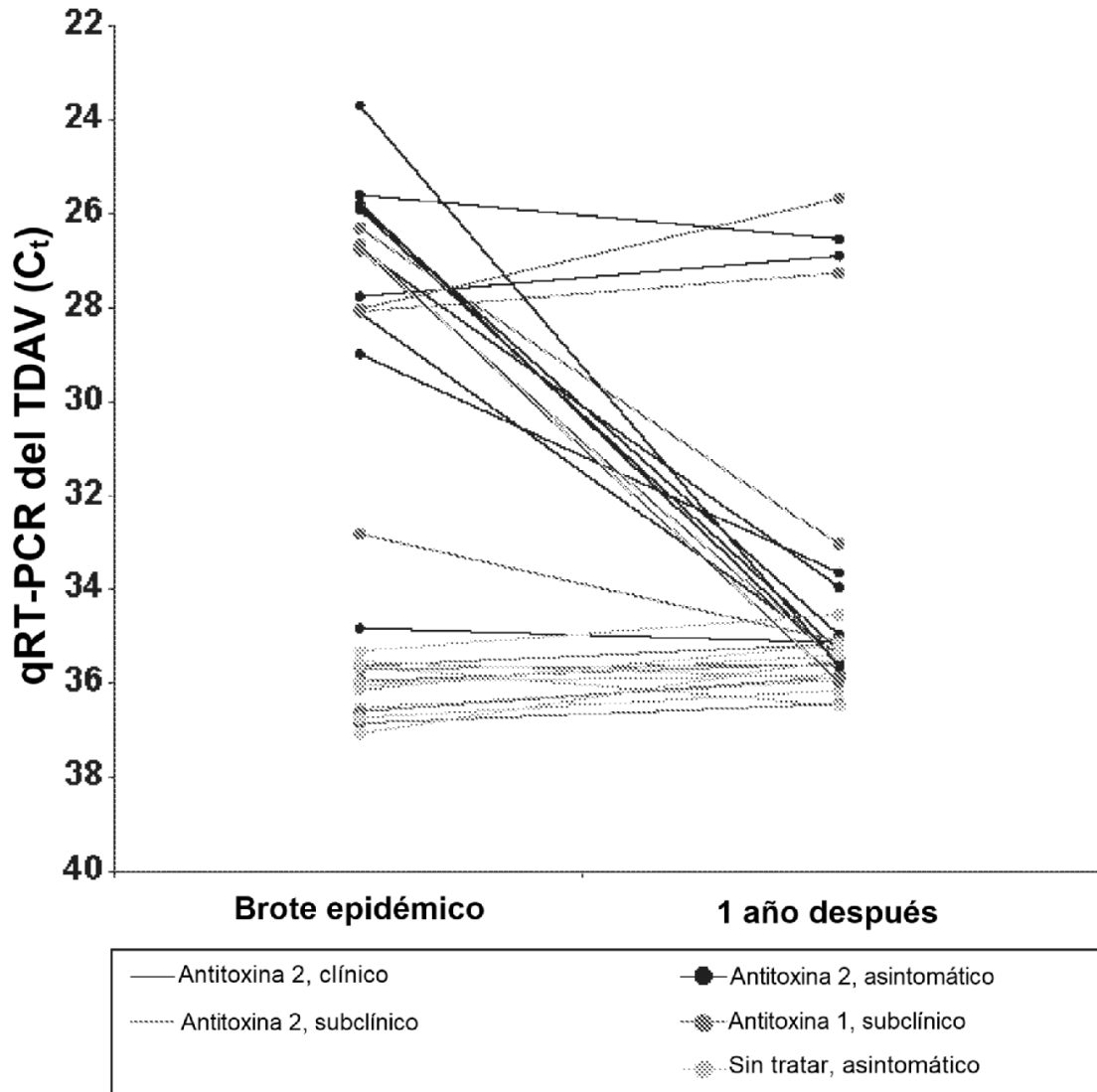


FIGURA 8



FIGURA 9A

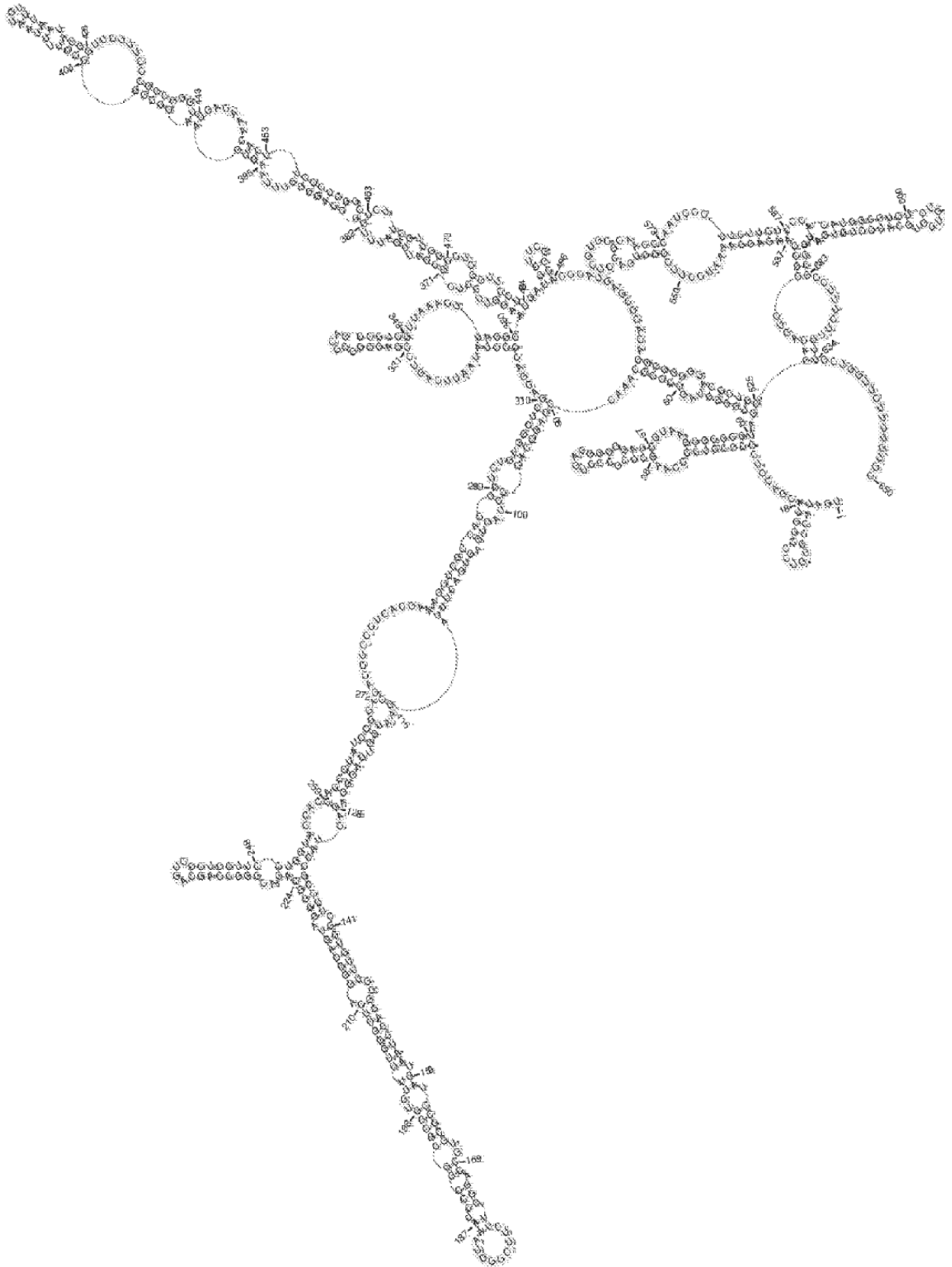


FIGURA 9B

